

Jenni Kalekivi

# Neljän *Lactobacillus amylovorus* -kannan probioottisten ominaisuuksien testaaminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioala  
Opinnäytetyö  
5.11.2012

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Jenni Kalekivi Neljän <i>Lactobacillus amylovorus</i> -kannan probioottisten ominaisuuksien testaaminen 27 sivua + 1 liite 5.11.2012
Tutkinto	laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	tutkijatohtori Ulla Hynönen lehtori Tiina Soininen
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian oppiaineelle. Työn tarkoituksena oli tutkia neljän sian suolistosta eristetyin <i>Lactobacillus amylovorus</i>-kannan mahdollisia probioottisia ominaisuuksia. Laktobasilleille tehdyillä testeillä selvitettiin niiden sitoutumistehokkuutta sian ruoansulatuskanavan musiiineihin sekä mahdollista kykyä estää enterotoksiinia tuottavan <i>Escherichia coli</i> -kannan kiinnittymistä porsaan suolistosta peräisin olevan solulinjan soluihin. Enterotoksinen <i>Escherichia coli</i> on yleinen porsaiden vieroitusripulin aiheuttaja. Sairastuneet porsaat kasvavat terveitä porsaita hitaammin sekä saattavat kuolla, mistä on taloudellista haittaa siantuottajille.</p> <p>Kiinnittymistä sian suoliston limaan kokeiltiin sekä kaupallisilla sian vatsan musiiineilla että siasta eristetyllä suolilimalla. Laktobasillit leimattiin SYTO9-fluorokromilla ja bakteerien kiinnittymisprosentit selvitettiin mittaamalla näytteiden fluoresenssit. Kiinnittymisenestokokeet suoritettiin neljällä erilaisella koejärjestelyllä, joista jokainen toistettiin vähintään kolme kertaa. Kokeiden tarkoitus oli selvittää, miten laktobasillit vaikuttavat kolibakteerin kiinnittymiseen IPEC-1-soluihin (porcine intestinal epithelial cell line), jos laktobasillit lisätään ennen kolibakteeria tai sen kanssa samaan aikaan sekä pystyvätkö ne syrjäyttämään jo kiinnittyneitä kolibakteereja. Kokeissa käytetty <i>Escherichia coli</i> leimattiin tritoidulla tymidiinillä ja näytteiden radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskurilla.</p> <p>Musiinikiinnittymiskokeissa tutkittavien laktobasillikantojen havaittiin kiinnittyvän testialustoihin, mutta toistokokeilla saatiin vaihtelevia tuloksia kiinnittymistehokkuuden suhteen. Laktobasillit vaikuttivat pystyvän kiinnittymään paremmin kaupallisiin sian vatsan musiiineihin kuin sian suolistosta eristettyyn limaan. Kiinnittymisenestokokeissa yhden laktobasillikannan havaittiin inhiboivan enterotoksista kolibakteeria, mutta kannan inhibointikyky oli positiivisena kontrollina testeissä käytettyyn laktobasillikantaan verrattuna heikkoa. Kolme muuta kantaa onnistuivat toisinaan inhiboimaan kolibakteeria, mutta useimmiten niiden lisäämisellä ei ollut merkitystä kolibakteerin kiinnittymiseen IPEC-1-soluihin.</p>	
Avainsanat	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , enterotoksinen <i>Escherichia coli</i> , IPEC-1-solut, nestetuikelaskuri, SYTO9

Author Title Number of Pages Date	Jenni Kalekivi Testing of probiotic properties of four <i>Lactobacillus amylovorus</i> strains 27 pages + 1 appendices 5 November 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Science
Specialisation option	
Instructors	Ulla Hynönen, Postdoctoral researcher Tiina Soininen, Lecturer
<p>In this study the aim was to find out if four <i>Lactobacillus amylovorus</i> strains from porcine intestine have probiotic properties. The adhesion properties of lactobacilli to porcine gastrointestinal tract mucins and the potency to inhibit adhesion of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> were tested. Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> can cause post-weaning diarrhea in piglets. The disease can lead to reduced growth rate in the piglets and even to death which causes economic losses in pig production farms.</p> <p>The adhesion of the lactobacilli on porcine intestinal mucus was tested with both commercial mucins from porcine stomach and with mucus isolated from the porcine intestine. Lactobacilli were labeled by fluorochrome SYTO9 and the fluorescence of the adhered lactobacilli was measured. The inhibitory effects of the lactobacilli on the adhesion of <i>Escherichia coli</i> to a porcine intestinal epithelial cell line (IPEC-1) were determined by measuring the amount of adhering <i>Escherichia coli</i> after the incubation with lactobacilli. Four different procedures were used in which when the lactobacilli were added before, after or at the same time with the <i>Escherichia coli</i>. Each procedure was repeated at least three times. <i>Escherichia coli</i> was labeled by tritiated thymidine and the radioactivity of the samples was measured by liquid scintillation.</p> <p>The <i>Lactobacillus</i> strains did adhere to all three types of mucins, but repeated tests gave different results. The strains adhered better to commercial mucins from porcine stomach than to the mucus isolated from porcine intestine. One of the four <i>Lactobacillus</i> strains did inhibit the adhesion of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> but its inhibitory effect was weak. The rest of the <i>Lactobacillus</i> strains did not inhibit the adhesion of the pathogen.</p>	
Keywords	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> , IPEC-1 cells, liquid scintillation counter, SYTO9

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Porsaiden vieroitusripuli	2
2.2	Ohutsuolen rakenne ja toiminta	3
2.3	Maitohappobakteerit ja bakteerien probioottiset ominaisuudet	5
2.4	Nestetuikelaskenta	6
3	Työn aineisto ja menetelmät	10
3.1	IPEC-1-solujen viljely	10
3.2	Kiinnittymisenestokokeet	11
3.3	Kiinnittymisenestokokeiden tulosten käsittely	17
3.4	Bakteereiden leimaaminen SYTO9-fluorokromilla	18
3.5	Musiinikiinnittymiskokeet	19
3.6	Musiinikiinnittymiskokeiden tulosten käsittely	20
4	Tulokset ja niiden tarkastelu	21
4.1	Kiinnittymisenestokokeiden tulokset	21
4.2	Musiinikiinnittymiskokeiden tulokset	24
5	Päätelmät	27
	Lähteet	28

## Liitteet

Liite 1. Kiinnittymisenestokokeiden tulokset

## Lyhenteet

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, soluviljelyssä yleisesti käytetty puskuri, joka ylläpitää elatusaineen fysiologista pH:ta
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite supplement, soluviljelyssä käytettävä ravinnelisiä
LB-liemi	Luria-Bertani, ravinnerikas bakteerien kasvatusliemi
MRS-liemi	de Man, Rogosa & Sharpe, erityisesti laktobasillien kasvattamiseen suunniteltu kasvatusliemi
PBS-puskuri	Phosphate buffered saline, yleisesti käytetty puskuroiva suolaliuos

## 1 Johdanto

Emästä vieroitettaessa porsaiden vasta-aineiden tuottokyky alenee, jolloin porsaat ovat herkempiä saamaan patogeenisen bakteerin aiheuttaman vieroitusripulin. Yleisin taudinaiheuttajista on enterotoksinia tuottava *Escherichia coli*. Se kulkeutuu suun kautta porsaan suolistoon, jossa kolibakteerien toiminta aiheuttaa suolen toimintahäiriöitä sekä voi vaurioittaa suolen sisäpintaa.

Taudin ehkäisemiseksi on koetettu löytää keinoja, koska porsaiden sairastelusta aiheutuu sikojen kasvattajille tappiota. Vieroitusripuliin sairastuneet porsaat kasvavat hitaammin tai voivat jopa kuolla. Aikaisemmin porsaiden vieroitusripulia on pyritty estämään antibioottien avulla, mutta nykyään niiden käyttö on kielletty. Apua taudin ehkäisemiseen toivotaan löytyvän probioottisten bakteerien syöttämisestä porsaille.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian oppiaineelle. Työn tavoitteena oli tutkia neljän *Lactobacillus amylovorus*-kannan mahdollisia probioottisia ominaisuuksia. Tutkittavat kannat on eristetty alun perin sian suolistosta tai rehusta, ja ne ovat osa sian ruuansulatuskanavassa normaalisti asustavaa mikrobistoa. Kannoille tehdyillä testeillä tutkittiin niiden sitoutumistehokkuutta sian ruuansulatuskanavan limaan sekä mahdollista kykyä estää enterotoksista *Escherichia coli*-kanta kiinnittymästä sian suolistosta peräisin oleviin soluihin.

## 2 Teoria

### 2.1 Porsaiden vieroitusripuli

Emästä erottaminen sekä muutokset kasvuympäristössä ovat aina stressaavia porsaille. Stressi alentaa porsaiden puolustusjärjestelmän toimintaa, jolloin vasta-aineiden tuottokyky heikentyy. Vieroituksen jälkeen myös emän ternimaidosta saatujen vasta-aineiden määrä porsaan veressä alkaa hiljalleen vähentyä. Tämän vuoksi juuri vieroitettujen porsaiden vasta-ainetaso on alhaisimmillaan ja vastustuskyky taudinaiheuttajia vastaan heikkenee. Terve porsas pystyy yleensä torjumaan suolistoon päässeet haitalliset bakteerit, mutta useat fysiologiset sekä ruokintaan ja ympäristöön liittyvät tekijät voivat horjuttaa porsaan elimistön tasapainoa vieroitusvaiheessa. Vastustuskyvyn heikentyessä suun kautta suolistoon kulkeutuneet patogeeniset bakteerit pystyvät lisääntymään suolistossa aiheuttaen suolen pinnan vaurioitumista ja suolen toimintahäiriöitä. Enterotoksinen *Escherichia coli* on yleisin vieroitusripulia aiheuttavista bakteereista. [1.]

Aiemmin Suomessa teolliseen rehuun lisättiin antibioottisia lisäaineita, joilla pyrittiin ennaltaehkäisemään haitallisten bakteerien lisääntymistä porsaiden suolistossa. Vuonna 1999 eniten käytettyjen antibioottien, olakvindoksin ja karbadoksin, käyttö kuitenkin kiellettiin, sen jälkeen kun ne luokiteltiin syöpää aiheuttaviksi aineiksi. Nykyään antibioottien käyttöä pyritään myös vähentämään myös siksi, että niiden runsas käyttö kehittää antibiooteille resistenttejä bakteerikantoja. Uusia keinoja antibioottien tilalle porsaiden vieroitusripulin ehkäisemiseksi etsitään, sillä tauti aiheuttaa siiankasvattajille rahanmenetystä porsaiden kuollessa. Vaikkei porsas kuolisikaan vieroitusripuliin, porsaan nuorena sairastama suolistotulehdus vaurioittaa usein suolen pintaa pysyvästi, jolloin vaikutukset näkyvät koko kasvatuskaudella ja teuraspaino saavutetaan useita päiviä terveenä säilynyttä sikaa myöhemmin. [1.]

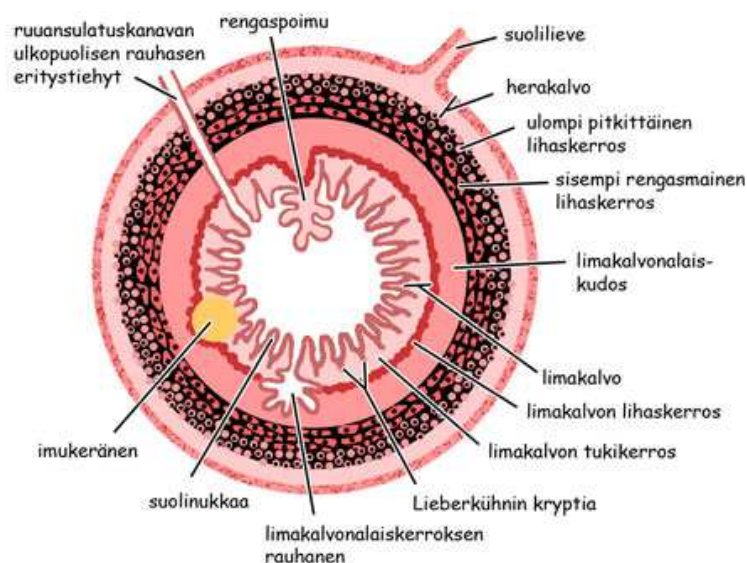
*Escherichia coli* on tasalämpöisten eläinten ja ihmisen ruuansulatuskanavan alemmissa osissa elävä bakteeri. Se kuuluu suolistossa normaalisti elävään mikrobistoon, josta ei ole haittaa isännälle. Osa *Escherichia coli* -kannoista kuitenkin kykenee tuottamaan enterotoksiineja, jotka aiheuttavat niiden isännälle ripulia. *Escherichia coli* on Gram-negatiivinen sauva. Se on fakultatiivinen anaerobi, joka kykenee liikkumaan

flagellojensa avulla. *Escherichia coli* kuuluu enterobakteerien heimoon ja kykenee tuottamaan energiansa joko fermentoimalla tai aerobisella soluhengityksellä. [2.]

Enterotoksinen *Escherichia coli* on yleinen syy juuri vieroitettujen porsaiden sairastumiseen tai kuolemaan. Jotta kolibakteeri voi aiheuttaa porsaalle vieroitusripulin, sen pitää pystyä tarttumaan porsaan suoliston soluihin sekä tuottaa enterotoksiinia. Tautia aiheuttavien kolibakteerien on todettu kiinnittyvän porsaan suolistoon fimbrioiden avulla. Fimbriat tarttuvat suoliston sisäpinnan epiteelisoluissa tiettyihin reseptoreihin. Epiteelisoluihin tarttuminen mahdollistaa bakteerien lisääntymisen suoliston pinnalla, joilloin bakteerien toiminta tuottaa enterotoksiineja. [3.]

## 2.2 Ohutsuolen rakenne ja toiminta

Sian ohutsuolessa tapahtuu ruuan pilkkoutumista sekä ravintoaineiden imeytyminen verenkiertoon. Ohutsuoli on ruuansulatuskanavan osista pisin ja se voidaan jakaa kolmeen osaan, pohjukaissuoleen, tyhjäsuoleen ja sykkyräsuoleen. Ohutsuolen seinämässä on useita kerroksia (kuva 1). Suolen sisin osa, *mucosa*, koostuu kolmesta kerroksesta, jotka ovat epiteeli, *lamina propria* ja *muscularis mucosae*. Suolen sisäpinta on hyvin voimakkaasti poimuttunut, mikä lisää ohutsuolen sisäpinta-alaa ja parantaa ravintoaineiden imeytymistä. Lisäksi pinta-alaa suurentavat nukkalisäkkeet sekä epiteelisolujen pinnalla olevat mikrovillukset. [4.]



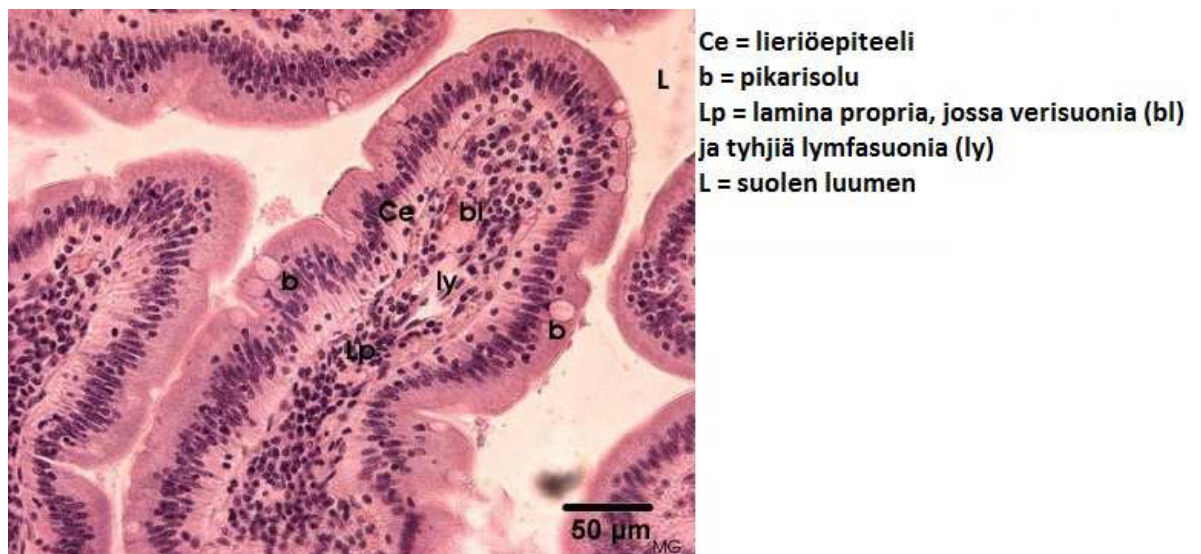
Kuva 1. Ohutsuolen rakenne [5]



Ohutsuolen epiteelissä on useita ruuansulatusentsyymejä tuottavia sekä aineiden imeytymisestä vastaavia enterosyyttisoluja. Lisäksi epiteelissä on hormoneja tuottavia soluja, limaa tuottavia pikarisoluja sekä Panethin soluja, jotka säätelevät ohutsuolen mikrobistoa. Lima toimii suojana hapanta ruokasulaa vastaan sekä samalla neutraloi sen happamuutta. *Mucosa*-kerrosta seuraava seinämäkerros on *submucosa*, jossa on hermoja, verisuonia, rasvaa ja sidekudosta. Uloimpana on lihaskerros, joka koostuu pitkittäisistä sekä rengasmaisista lihassyistä. [4.]

Epiteeli on kehoa ja elimiä peittävä verisuoneton kudokset kerros. Kaikilla epiteeleillä on kolme yhteistä ominaispiirrettä. Solut ovat tiiviisti lähekkäin ja kiinnittyvät tiukasti toisiinsa soluliitoksilla. Solujen pohjaosa on kiinnittyneenä alapuoliseen kalvoon, jolta solut saavat verisuonten puuttuessa ravintonsa. Epiteelisolujen rakenne on polarisoitunut eli niillä on kolme erilaista pintaa, joista kullakin on omat ominaisuutensa. Apikaalinen osa on solun vapaapinta, joka on kosketuksissa ilman tai nesteen kanssa. Lateraalinen osa kiinnittyy toisiin epiteelisoluihin. Pohjaosaa, jonka kautta solut saavat ravintoa, kutsutaan myös basaaliseksi osaksi. [4.]

Epiteelityyppien erottelu perustuu solukerrosten määrään ja solujen muotoon. Ohutsuolen sisäpinnassa on yksinkertaisia lieriöepiteelisoluja (kuva 2), joiden korkeus on leveyttä suurempi ja niiden pinnalla on usein mikrovilluksia. Ohutsuolen lieriöepiteelien tehtävänä on aineiden imeytyminen. [4.]



Kuva 2. Suurennos pohjukaissuolen villuksesta [6]

### 2.3 Maitohappobakteerit ja bakteerien probioottiset ominaisuudet

Probiooteiksi luokitellaan elävät mikrobit, joiden toiminnasta on hyötyä niiden isännän terveydelle. Probioottinen ominaisuus on esimerkiksi kyky estää patogeenien lisääntymistä ruuansulatuskanavassa esimerkiksi kilpailemalla patogeenien kanssa tarttumistilasta tai tuottamalla patogeenia inhiboivia aineita. Myös kykyä kiinnittyä ruuansulatuskanavaan pidetään tärkeänä ominaisuutena probiootille. Kiinnittymiskyky voi olla myös väliaikaista. Probiootit eivät saa kuulua patogeenisiksi luokiteltuihin bakteereihin ja niiden tulisi olla geneettisesti stabiileja. Probiootin olisi hyvä kuulua sille tarkoitetun isännän normaaliin mikrobistoon sekä sen tulee säilyä toimintakykyisenä kohdeisännässä. Probiootilla pitää olla kyky tuottaa ainakin yhtä terveyttä edistävää ominaisuutta, joka on todistettu kliinisin kokein. Mikrobin ominaisuudet ja luokittelu tulee tuntea hyvin ennen sen käyttämistä probioottina. [7; 8.]

Maitohappobakteerit ovat ryhmä Gram-positiivisia bakteereja, joita yhdistävä tekijä on maitohapon tuottaminen joko ainoana tai päätuotteena sokereiden fermentoinnissa. Maitohappobakteereihin kuuluva *Lactobacillus*-suku koostuu biokemiallisilta, fysiologisilta ja genotyypillisiltä ominaisuuksiltaan hyvin erilaisista bakteereista. Laktobasilleja löytyy luonnosta hyvin erilaisista ympäristöistä, joissa on niiden käytettäväksi runsaasti hiilihydraatteja tai proteiineja. Monet laktobasillit ovat osa ihmisen ja eläinten ruuansulatuskanavassa asustavaa mikrobistoa. Ruokateollisuudessa laktobasilleja käytetään paljon ja ne luokitellaan turvallisiksi. Useilla laktobasilleilla väitetään olevan terveyttä edistäviä ominaisuuksia, minkä vuoksi niitä käytetään probiootteina monissa tuotteissa. [9.]

Laktobasillien on useissa testeissä havaittu sitoutuvan ihmisen ja eläinten ruuansulatuskanavan epiteelisoluihin sekä kudospäätteisiin. Kiinnittymisen tehokkuutta on arvioitu esimerkiksi tarkastelemalla mikroskoopilla tai käyttämällä radioaktiivisesti leimattuja bakteereita. Suolistossa elävien bakteerien on arveltu suojaautuvan suolen peristalttiselta liikkeeltä sitoutumalla epiteelisoluihin ja musiiniin. Sitoutumista isännän kudoksiin voivat edesauttaa monet laktobasillien ominaisuuksista, kuten solun pinnan hydrofobisuus, autoaggregaatio sekä Gram-positiivisille bakteereille ominaiset lipoteikohapot ja pintaproteiinit. [10.]

Useiden bakteerien ja arkkien soluseinän uloimpana osana on pintakerrosproteiineista koostuva kerros (surface layer). Monilla *Lactobacillus*-sukuun kuuluvilla bakteereilla on pintaproteiinikerros. Nämä kerrokset ovat hilamaisia rakenteita, jotka koostuvat proteiini- tai glykoproteiinialayksiköistä. Bakteerisolun proteiineista 10–15 % on pintakerrosproteiineja. Kerroksien rakenne on hyvin huokoinen: jopa 70 % siitä voi olla huokosia. Kerrokset voivat toimia suojaavana kerroksena, ylläpitää solun muotoa, toimia molekyylien ja ionien sisäänotossa sekä auttaa solua kiinnittymään ympäristöönsä. Pintaproteiinikerroksen osuutta bakteerien kykyyn kiinnittyä eläinten kudoksiin on tutkittu paljon, ja eräillä laktobasilleilla nämä kerrokset osallistuvat bakteerien kiinnittymiseen isäntäeläimen kudoksiin. [9; 11.]

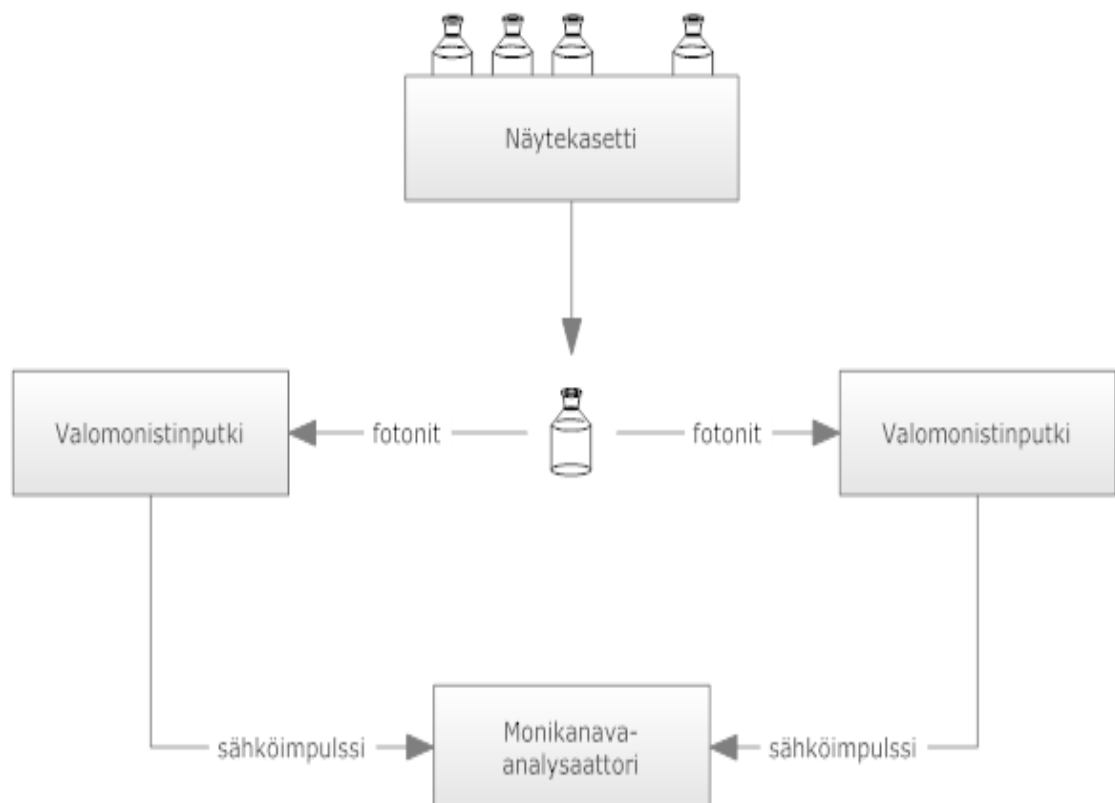
Sian ruuansulatuskanavassa elää runsas määrä erilaisia mikrobeja, joiden toiminnasta on hyötyä isäntäeläimelle. Ne estävät patogeenisten mikrobien kiinnittymistä ruuansulatuskanavaan, stimuloivat isännän puolustusjärjestelmää, hajottavat ravintoaineita sekä tuottavat vitamiineja. Maitohappobakteereista eniten sian suolistossa on laktobasilleja. *Lactobacillus amylovorus* on Gram-positiivinen, anaerobinen sauva, joka kasvaa yksittäin tai lyhyinä ketjuina. Bakteeri ei tuota itiöitä ja on liikuntakyvytön. Sokereita fermentoidessaan bakteeri tuottaa maitohapon lisäksi pieniä määriä etikkahappoa. [10; 12.] Laboratoriokokeissa *Lactobacillus amylovorus* DSM16698 -kannan on todettu omaavan potentiaalisia probioottisia ominaisuuksia, kuten kyvyn estää toiminnallaan patogeenien kiinnittymistä sian suoliston epiteelisoluihin. [13]

## 2.4 Nestetuikelaskenta

Nestetuikelaskenta on radioaktiivisuuden mittaamenetelmä, jota käytetään useimmiten  $\beta$ -säteilyn mittaamiseen. Radioaktiivisten aineiden atomeilla on joko liian paljon tai liian vähän neutroneita ytimessään, jotta ne olisivat vakaita. Radioaktiiviset atomit muuttavat spontaanisti ydintään, jolloin ne emittoivat joko energiaa tai partikkeleita.  $\beta$ -säteilyn partikkelit ovat korkeaenergisiiä elektroneja tai positroneja, joita syntyy kun atomin ytimessä neutroni muuntuu protoniksi tai päinvastoin. Nestetuikelaskennassa näyte sekoitetaan aineeseen, joka fluoresoi reagoidessaan näytteestä tulevan radioaktiivisen säteilyn kanssa. [14.]

Mitattava näyte koostuu kolmesta komponentista, jotka ovat radioaktiivinen näyte, orgaaninen liuotin ja tuikeaine. Liuottimen on pystyttävä liuottamaan näyte ja tuikeaine sekä siirtämään energiaa tehokkaasti tuikeaineelle. Aromaattiset yhdisteet toimivat parhaiten liuottimina nestetuikelaskennassa. Tuikeaineen tehtävänä on muuntaa energia valofotoneiksi. Nykyisin on saatavilla useita kaupallisia tuikeaineita, joissa on valmiina sekä tuikeaine että liuotin. [14; 15.]

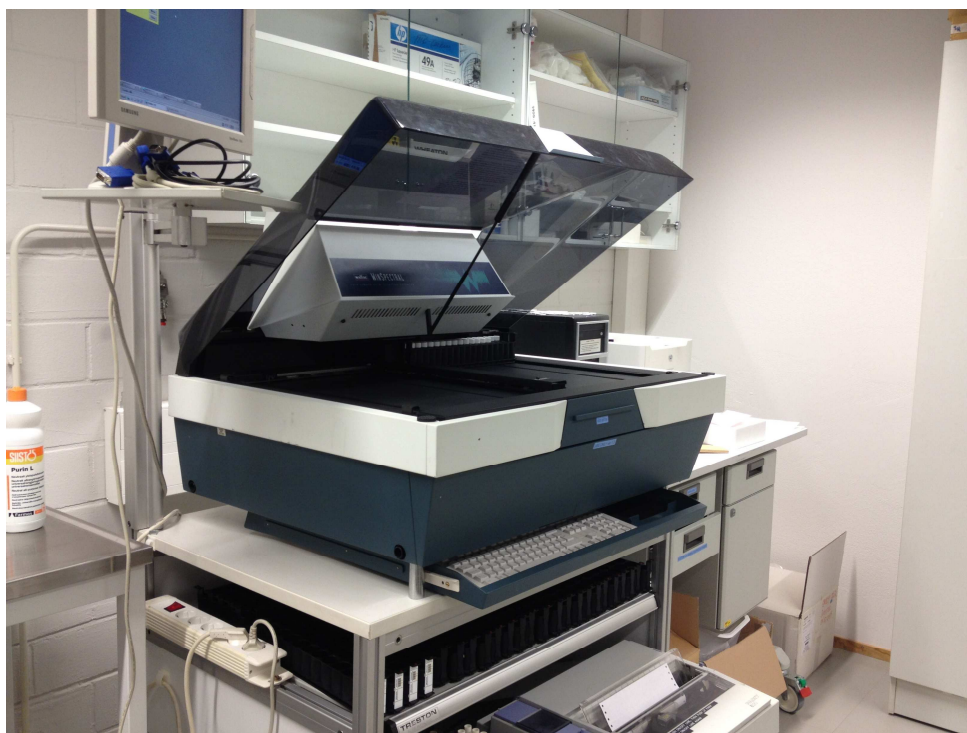
Viskoosissa liuoksessa  $\beta$ -partikkelit pystyvät kulkemaan vain lyhyen matkan, ennen kuin ne luovuttavat energiansa. Eniten liuoksessa on liuotinmolekyylejä, joten  $\beta$ -partikkeleilta vapautuva energia siirtyy todennäköisimmin niille. Liuotinmolekyylit virittyvät ja siirtävät energiaa eteenpäin seoksen muille molekyyleille. Lopulta energia siirtyy tuikeaineille, jotka virittyneinä luovuttavat energiansa emittoimalla valoa. Tuikeaineen emittoima valo on lähinnä tuikahdus, jonka kesto on muutamia nanosekunteja. Nestetuikelaskuri mittaa näytteestä tulevia tuikahduksia. Kuvassa 3 on havainnollistettu nestetuikelaskurin toimintaperiaatetta. [14; 15.]



Kuva 3. Nestetuikelaskurin toimintaperiaate

Nestetuikelaskimen perusosa on valomonistin, jonka päässä on fotokatodi. Valomonistinputkia on yleensä kaksi. Niiden avulla tukeaineen emittoimat valontuikahdukset saadaan muutettua sähköimpulsseiksi. Mitatut sähköimpulssit ovat verrannollisia  $\beta$ -partikkelien vapauttamaan energiaan. Yleensä nestetuikelaskimessa on kaksi valomonistinta. Sähköimpulssit kerätään monikanava-analysaattoriin, jossa ne lasketaan ja jaotellaan energiatason mukaan. Kerätyt impulssit muutetaan digitaaliseen muotoon ja ilmoitetaan CPM-yksikössä (counts per minute). [15.]

Näytteissä tapahtuu aina jonkin verran vaimennusta, jolloin näytteitä mitattaessa nestetuikelaskuri rekisteröi vähemmän radioaktiivisia hajoamisia kuin niitä todellisuudessa näytteessä tapahtuu. Näytteissä vaimennusta aiheuttaa  $\beta$ -hiukkasen energian absorboituminen näyteneesteessä jo ennen kuin se ehtii aiheuttaa tukeaineen virittymisen. Näytteissä tapahtuvan vaimennuksen vuoksi nestetuikelaskennassa täytyy aina selvittää vaimennuksen vaikutukset tuloksiin. Nestetuikelaskureissa (kuva 4) on usein ohjelmisto, joka korjaa näytteiden tulokset vertaamalla niitä tiettyyn standardiin. [14.]



Kuva 4. Perkin Elmerin Wallac Swinspectral 1414 -nestetuikelaskuri

Solunäytteille radioaktiivisena leimana voidaan käyttää tritioitua tymidiiniä. Tritium on vedyn ainut radioaktiivinen isotooppi, ja sen yleinen symboli on  $^3\text{H}$ . Vedyn yleisimmän muodon ytimessä on vain yksi protoni, mutta tritiumin ydin koostuu kahdesta neutronista ja yhdestä protonista. Tämän vuoksi tritiumin ydin on epävaka ja se pyrkii kokemaan radioaktiivisen muutoksen, jonka aikana tritiumatomi muuttuu ei-radioaktiiviseksi heliumatomiksi. Prosessin aikana vapautuu radioaktiivista  $\beta$ -säteilyä. Tritiumin vapauttama  $\beta$ -säteily luokitellaan heikoksi, ja partikkelit menettävät energiansa kuljettuaan 6 mm:n matkan ilmassa. Nämä partikkelit eivät myöskään pysty tunkeutumaan ihmisen ihon läpi. Tritiumin puoliintumisaika on 12,3 vuotta, ja sillä on samat kemialliset ominaisuudet kuin vedyllä. [16.]

Tritioitua tymidiiniä käytetään laboratorioissa esimerkiksi solujen jakaantumisen mittaamiseen. Radioaktiivisesti leimattu nukleosidi tunkeutuu solujen sisälle. Jakautuessaan solu kahdentaa DNA:nsa, jolloin tritioitu tymidiini liittyy osaksi solun kromosomaalista DNA:ta.  $\beta$ -säteilyä mittaavalla nestetuikelaskurilla voidaan mitata solujen DNA:n radioaktiivisuus.

### 3 Työn aineisto ja menetelmät

#### 3.1 IPEC-1-solujen viljely

Kiinnittymisenestokokeissa käytetty IPEC-1-solulinja (porcine intestinal epithelial cell line) on saatu eristämällä epiteelisoluja päivän ikäisten imettämättömien porsaiden ohutsuolesta. Solulinjaa ei ole muokattu kuolemattomaksi, joten se toimii paremmin porsaan suoliston epiteelisolujen mallina kuin muokatut solulinjat. [17.]

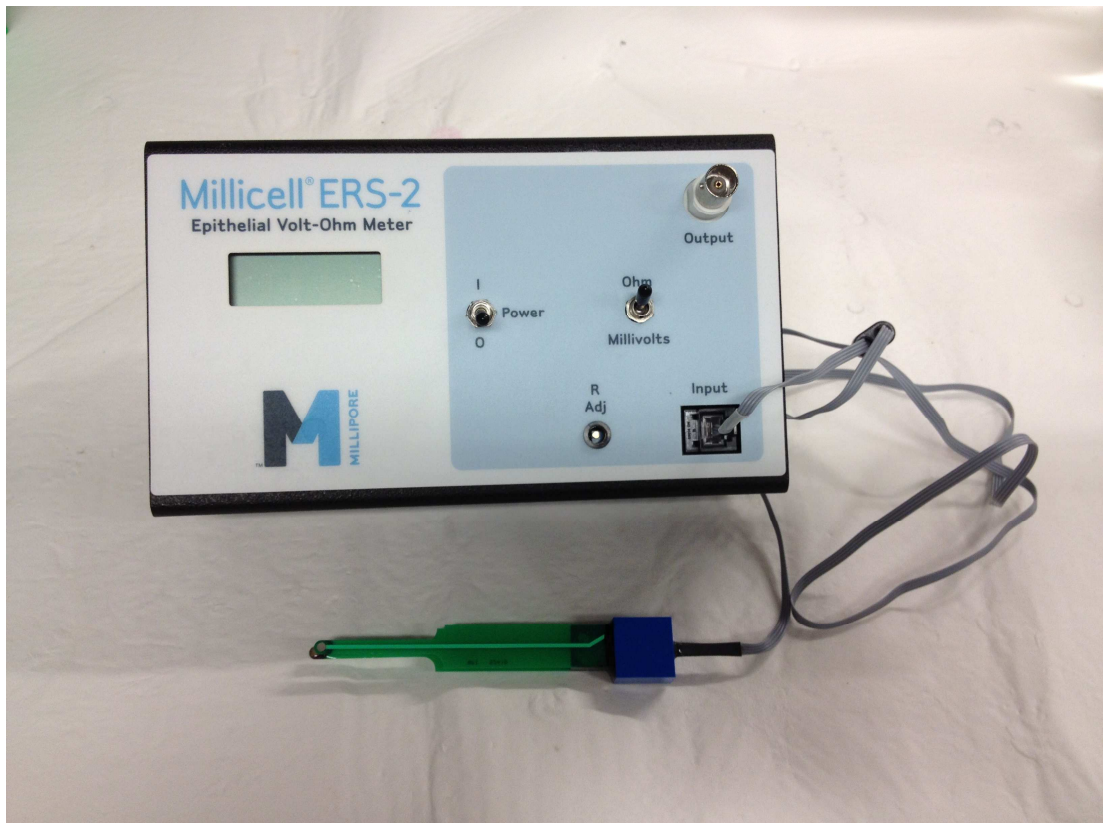
Soluja viljeltiin T75-soluviljelypulloissa (Greiner Bio-One) +39 °C:ssa 5 prosentin CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa. Elatusaineena käytettiin DMEM/F12 1:1 Mixture-liuosta (Pan Biotech), johon oli lisätty naudan sikiön seerumia (Pan Biotech), HEPES-puskuria (Pan Biotech), ITS-ravinnelisää (Pan Biotech) ja epidermaalista kasvutekijää (BD Biosciences). Elatusaine steriilisuodatettiin ennen käyttöä ja säilytettiin lasipullossa +4 °C:ssa.

Solut jaettiin uusiin kasvatuspulloihin kahdesti viikossa ja pullon pohjalla kasvavasta solumatosta pyrittiin saamaan ennen jakamista 80–90-prosenttisesti peittävä. Käytössä olevat solut jaettiin noin 20 kertaa, minkä jälkeen ne vaihdettiin uusiin. Solujen jakaminen aloitettiin pesemällä solut PBS-puskurilla (DPBS Lonza BioWhittaker). Solujen irrottamiseen pullon seinästä käytettiin TrypLE-trypsiiniliuosta (Invitrogen), jota lisättiin soluviljelypulloon 5 ml. Trypsiiniliuoksen annettiin vaikuttaa +39 °C:ssa noin 20 minuuttia, kunnes solujen havaittiin irtoavan pohjasta.

Trypsiiniliuoksen inaktivoimiseksi kasvatuspulloon lisättiin 5 ml elatusainetta ja loput solut pyrittiin saamaan irti huuhtelemalla pullon pohjaa varovasti pipetillä. Irrotetut solut kerättiin sentrifugoimalla. Kerätyt solut suspensoitiin 10 ml:aan elatusainetta. Solupitoisuuden laskennassa käytettiin C-Chip-hemosytometriä (Digital Bio). Tarvittava määrä soluja siirrettiin uusiin kasvatuspulloihin, joihin oli laitettu 20 ml elatusainetta. Siirrettävä solumäärä vaihteli noin 150 000–280 000 solun välillä, ja se arvioitiin aina solujen aikaisempien kasvutulosten perusteella.

Kokeissa käytettiin Thincert-soluviljelykaivoja ja 24-kaivoisia kuoppalevyjä (Greiner Bio-One). Levyjen valmistamista varten solut irrotettiin trypsinoimalla samalla tavalla kuten uusiin pulloihin jaettaessa. Solupitoisuuden laskemisen jälkeen soluista tehtiin laimennos, jonka pitoisuus oli 200 000 solua/ml. Thincert-kaivot asetettiin

kuoppalevyille. Kaivojen alapuolisiin kuoppiin lisättiin 1,2 ml elatusainetta ja kaivoihin 350 µl solulaimennosta. Soluja kasvatettiin +39 °C:ssa 5 prosentin CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa. Levyjä voitiin käyttää kokeisiin 4–5 vuorokauden kuluttua. Ennen koetta levyllä kasvavien solujen TEER-arvot (Trans Epithelial Electrical Resistance) mitattiin Millicell ERS-2 Epithelial Volt-Ohm Meter -laitteella (kuva 5). TEER-arvot kuvaavat kaivon pohjalla kasvavan solukerroksen yhtenäisyyttä ja erilaistumisastetta. Kokeissa käytettävien solujen arvojen tuli olla vähintään 1000 Ωcm<sup>2</sup>.



Kuva 5. Millicell ERS-2 -laite

### 3.2 Kiinnittymisenestokokeet

Kiinnittymisenestokokeilla haluttiin selvittää neljän laktobasillikannan (taulukko 1) mahdollista kykyä estää patogeenista *Escherichia coli* -kanta kiinnittymästä IPEC-1-soluihin. Erilaisia koejärjestelyitä oli neljä, joista jokainen toistettiin vähintään kolme kertaa. Laktobasillikanta GRL1110 toimi kokeessa positiivisena kontrollina. Tämän kannan on havaittu sitoutuvan IPEC-1-soluihin ja estävän enterotoksisen *Escherichia coli* -bakteerin sitoutumista. [13.]

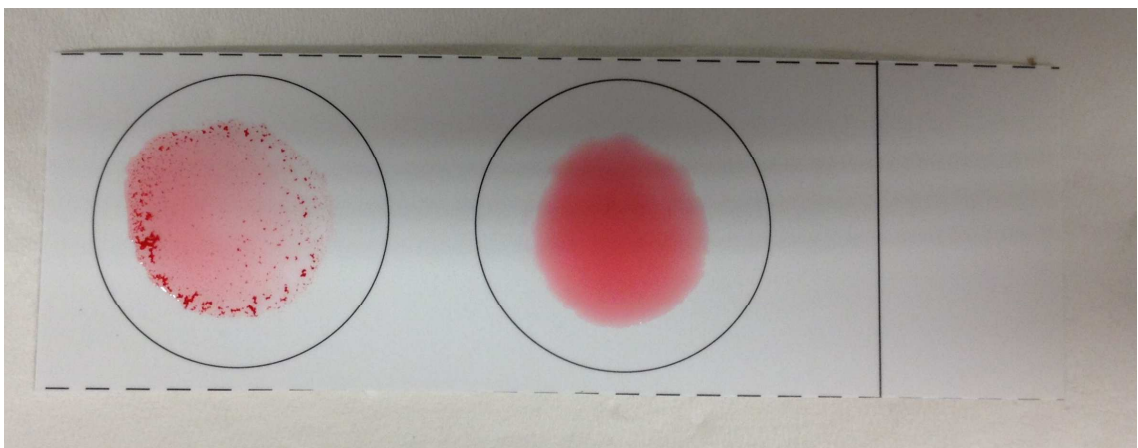


Taulukko 1. Työssä käytetyt bakteerit, testattavat bakteerikannat on merkitty vaaleansinisellä ja positiivisena kontrollina käytetty kanta vihreällä

Laji	Kanta	Alkuperä
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1110	DSM 16698; sian suolisto
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1111	DSM 20531; rehu
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1114	mikrobiologian osasto, eristetty sian suolistosta
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1116	mikrobiologian osasto, eristetty sian suolistosta
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1117	mikrobiologian osasto, eristetty sian suolistosta
<i>Escherichia coli</i> F4 <sup>+</sup> , ETEC	PEL61	mikrobiologian osasto, saatu

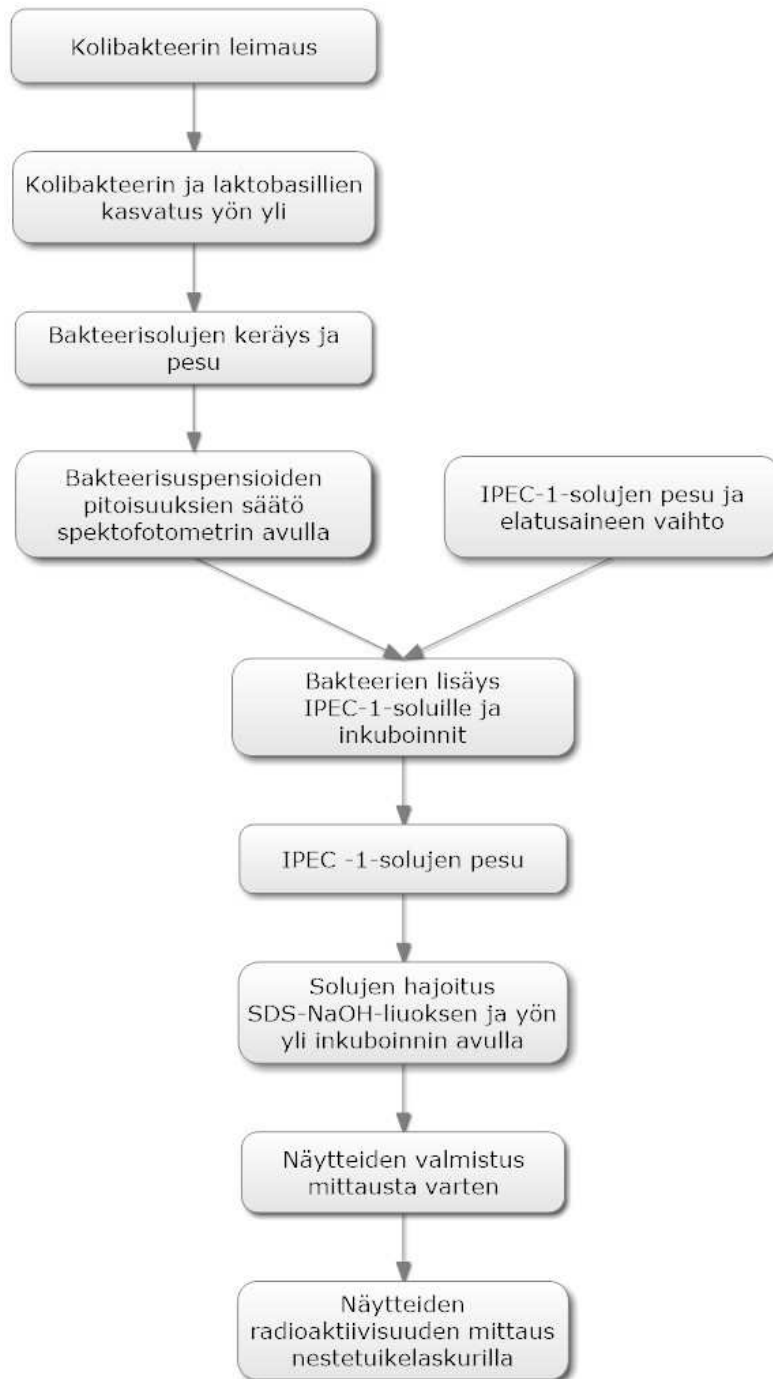
Kokeissa käytetty *Escherichia coli* -bakteerikanta leimattiin tritoidulla tymidiinilla. Kolibakteeria kasvatettiin LB-liemessä ravistuksessa +37 °C:ssa aamusta iltapäivään kunnes kasvatusliemi näytti samealta. Leimaaminen suoritettiin siirrostamalla 50 µl bakteeria 5 ml:aan LB-lientä, johon oli lisätty 10 µCi/ml <sup>3</sup>H-tymidiiniä (Perkin Elmer, 1 mCi/ml) ja kasvattamalla bakteeria yön yli ravistuksessa +37 °C:ssa.

Fimbrex K88 -testillä (Veterinary Laboratories Agency) varmistettiin, että kokeessa käytetyllä kolibakteerikannalla on fimbrioita, joilla se kykenee tarttumaan epiteelisoluihin. Testi on lateksiagglutinaatio, jossa F4-fimbriat aiheuttavat bakteerien selkeästi havaittavaa sakkaantumista (kuva 6). Testi suoritettiin testisarjan reagensseilla ja ohjetta noudattaen.



Kuva 6. Fimbrex K88-testisarjalla suoritettu lateksiagglutinaatiotesti. Vasemmalla näkyy positiivinen tulos, jossa näyte on selkeästi sakkaantunut. Oikealla on negatiivinen kontrolli.

Kaikissa koejärjestelyissä kolibakteerin leimaus ja bakteerien sekä IPEC-1-solujen valmistelu koetta varten suoritettiin aina samalla tavalla. Kuvassa 7 on esitetty kaavio kiinnittymisenestokokeen suorittamisesta.



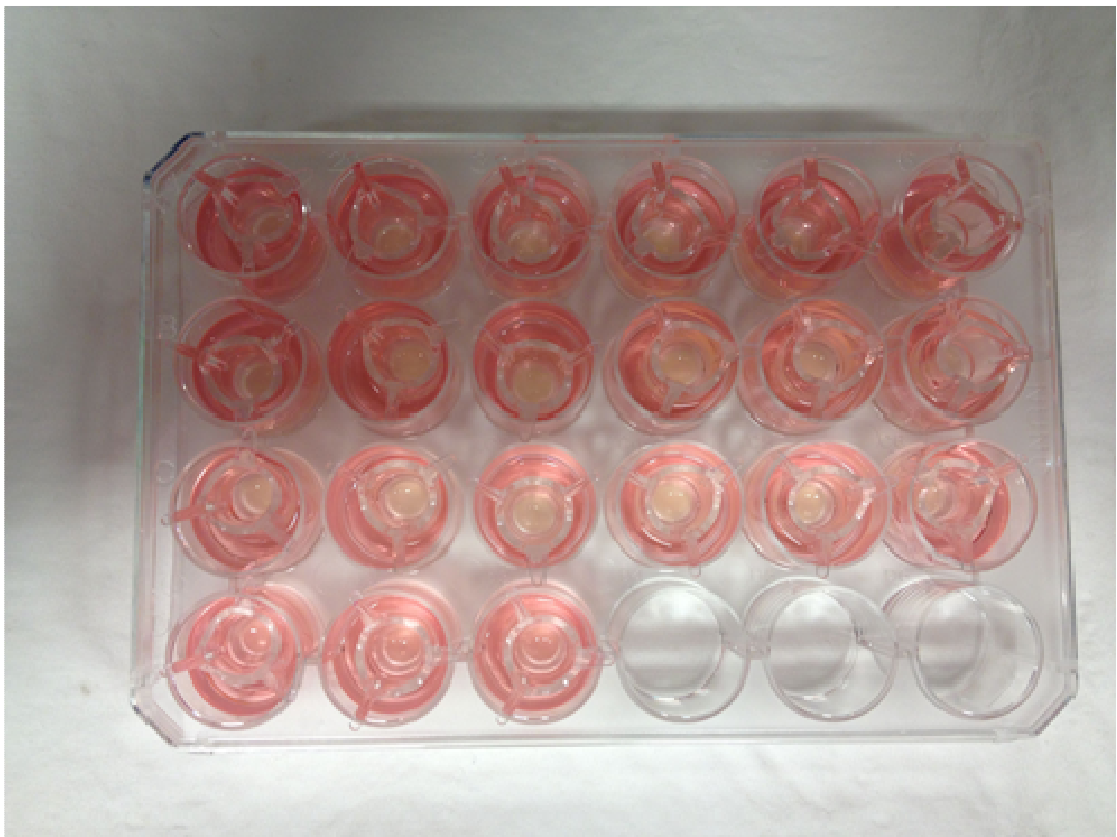
Kuva 7. Kiinnittymisenestokokeen työkaavio

Kokeessa käytettäviä laktobasillikantoja kasvatettiin koetta varten staattisesti MRS-liemessä anaerobiastiassa +37 °C:ssa yön yli. Laktobasillit kerättiin sentrifugoimalla

4500 g:n voimalla 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Kolibakteerit kerättiin 3 ml:sta kasvatuslientä sentrifugoimalla 3000 g:n voimalla 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Bakteerit pestiin kahteen kertaan PBS-puskurilla ja suspensoitiin DMEM/F12-elatusaineeseen.

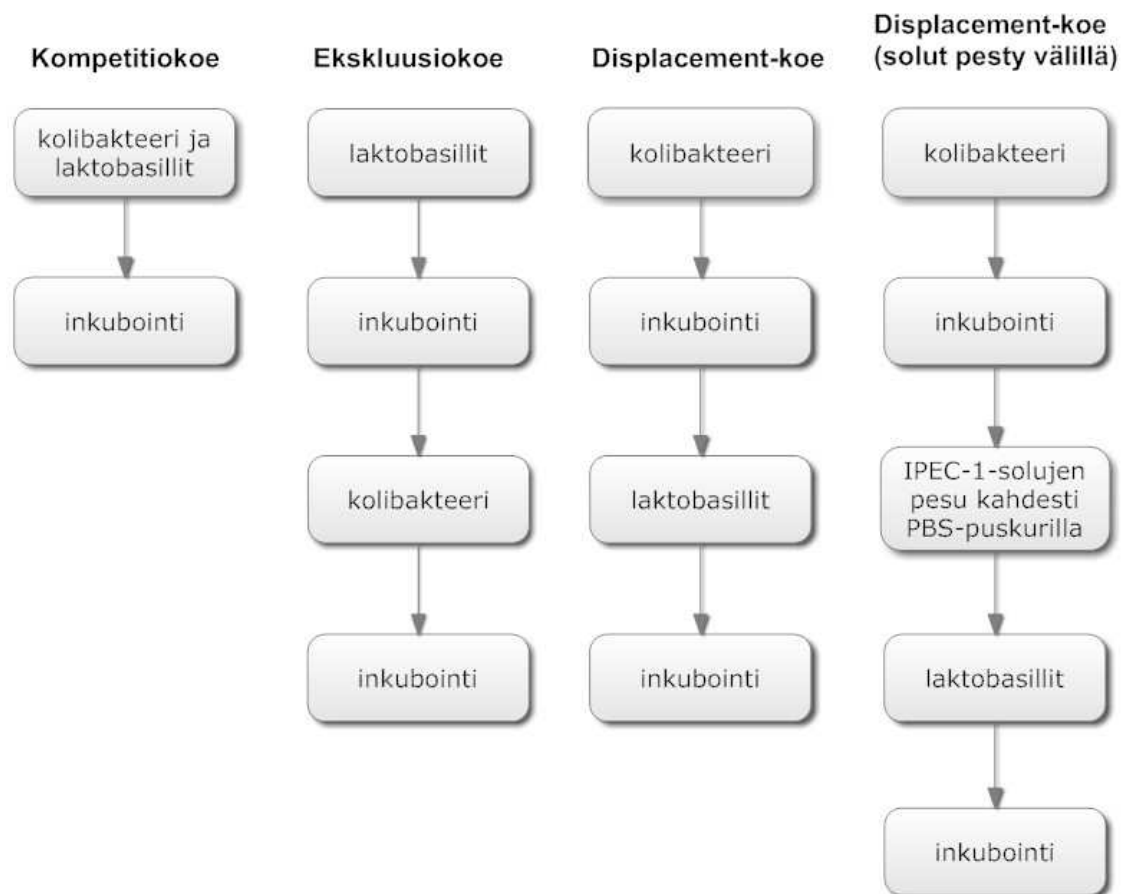
Bakteerisuspensioiden pitoisuudet säädettiin spektrofotometrin avulla. Halutussa pitoisuudessa laktobasilleilla absorbanssi 600 nm:llä oli 6 ja kolibakteerilla 0,6. Pitoisuuksissa hyväksyttiin 10 prosentin poikkeama kumpaankin suuntaan. Säädetyt pitoisuudet tarkistettiin tekemällä kaksi rinnakkaista mittausta. Kolibakteerin kasvatusliemestä, soluista sekä säädetystä solulaimennoksesta otettiin jokaisesta 100 µl talteen.

Kuoppalevyllä kasvatetut IPEC-1-solut (kuva 8) valmisteltiin kokeita varten vaihtamalla Thincert-kaivojen alapuolisissa kuopissa olevan elatusaineen tilalle DMEM/F12-elatusainetta. Thincert-kaivojen pohjalla olevat solut pestiin kerran PBS-puskurilla.



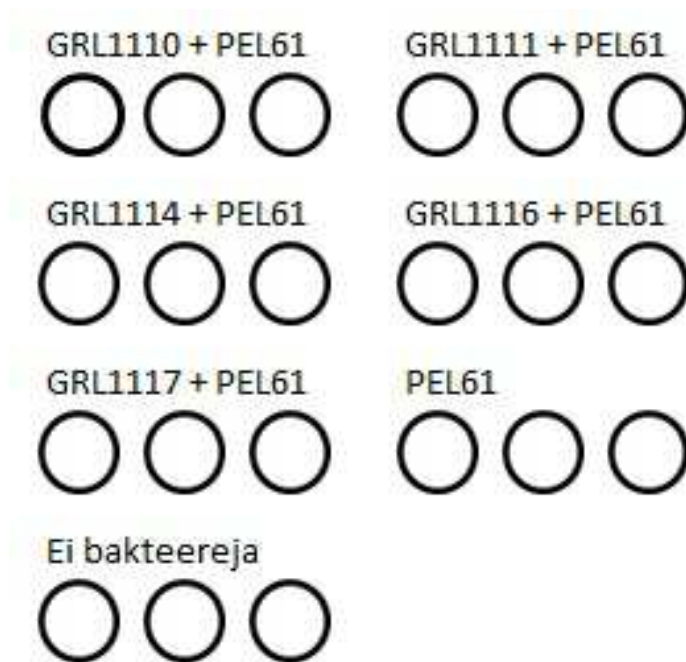
Kuva 8. Thincert-kaivot, joiden pohjalla kasvamassa IPEC-1-soluja

Koejärjestelyt poikkesivat toisistaan sen perusteella, missä järjestyksessä bakteerit lisättiin IPEC-1-soluille (kuva 9). Kompetitiokokeessa laktobasillit sekä kolibakteeri laitettiin samaan aikaan. Eksluusiokokeessa laktobasillit laitettiin IPEC-1-soluille ensin ja niille annettiin aikaa kiinnittyä ennen kolibakteerin lisäämistä. Displacement-kokeessa vastaavasti annettiin kolibakteerin kiinnittyä ensin IPEC-1-soluihin ennen laktobasillien lisäystä, jotta nähtäisiin kykenevätkö laktobasillit syrjäyttämään kiinnittyneitä kolibakteereja. Displacement-kokeesta suoritettiin myös versio, jossa kolibakteerin lisäyksen ja inkuboinnin jälkeen IPEC-1-solut pestiin kahdesti PBS-puskurilla. Solujen pesulla saatiin poistettua kiinnittymättömät kolibakteerit ennen kuin laktobasillit lisättiin. Kaikissa koejärjestelyissä bakteerien lisäyksen jälkeen soluja inkuboititi aina tunnin verran  $+37^{\circ}\text{C}$ :ssa viiden prosentin  $\text{CO}_2$ -pitoisuudessa.



Kuva 9. Koejärjestelyt ja bakteerien lisäysjärjestys IPEC-1-soluille

Laktobasilleja sekä kolibakteeria pipetoitiin 100 µl yhtä kaivoa kohden pipetointikaavion (kuva 10) mukaisessa järjestyksessä. Kompetitiokokeessa laktobasillit ja kolibakteeri sekoitettiin keskenään juuri ennen IPEC-1-soluille lisäämistä ja bakteerisekoituksia pipetoitiin 200 µl yhtä kaivoa kohden. Kaivoihin, joihin ei tullut bakteereja, lisättiin elatusainetta inkubointien ajaksi.



Kuva 10. Pipetointikaavio

Inkubointien jälkeen Thincert-kaivot pestiin viidesti PBS-puskurilla ja elatusaine poistettiin huolellisesti kaivojen alapuolisista kuopista. Solujen hajottamiseksi kaivoihin sekä molempiin kolibakteerisoluihin talteen otettuihin näytteisiin lisättiin 1 % SDS-0,1 M NaOH -liuosta ja niitä inkuboitettiin yön yli +37 °C:ssa.

Hajonnut solumassa kerättiin Thincert-kaivoista, kuopista sekä kaivojen pohjasta. Radioaktiivisuuden mittausta varten näytteet siirrettiin 6 ml:n polyetyleenipulloihin, joihin oli laitettu 3 ml tuikenestettä (Optiphase Hisafe 3, Perkin Elmer). Bakteerien leimautumistehokkuuden ja IPEC-1-soluille lisättyjen bakteerien radioaktiivisuuden määrittämiseksi valmistettiin näytteet (taulukko 2). Kaikkia näytteitä tehtiin kolme rinnakkaista. Näytteet sekoitettiin huolellisesti vorteksoimalla ja pulloja kääntelemällä. Näytteiden radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskurilla (Wallac Swinspectral 1414, Perkin Elmer).

Taulukko 2. IPEC-soluille lisättyjen bakteerien radioaktiivisuuden sekä leimaustehokkuuden määrittämiseksi valmistetut näytteet

<b>Näyte</b>	
kolibakteerin supernatantti	10 µl
kolibakteerisolut + SDS-NaOH-liuos	20 µl
kolibakteerisolut, jotka oli säädetty spektrofotometrillä + SDS-NaOH-liuos	40 µl
DMEM/F12-elatusaine	100 µl

### 3.3 Kiinnittymisenestokokeiden tulosten käsittely

Thincert-kaivoista saaduista tuloksista vähennettiin ensin IPEC-1-solujen aiheuttaman taustan keskiarvo. Solukaivoihin lisättyjen kolibakteerien aktiivisuus laskettiin spektrofotometrillä säädetyn kolibakteerilaimennoksen avulla. Kolibakteerilaimennoksen arvoille laskettiin keskiarvo, joka kerrottiin viidellä, koska mitatussa näytteessä oli kolibakteerilaimennosta 20 µl ja IPEC-1-soluille sitä lisättiin 100 µl ja saadusta tuloksesta vähennettiin elatusaineen aiheuttaman taustan keskiarvo (kaava 1).

$$\text{dpm (säädetty kolibakteerisolut)} \cdot 5 - \text{dpm (elatusaine)} \quad (1)$$

Se, montako prosenttia kaivoon lisätyistä kolibakteerisolusta oli kiinnittynyt IPEC-1-soluihin, laskettiin jakamalla Thincert-kaivoista saadut aktiivisuudet lisättyjen kolibakteerien aktiivisuuksilla (kaava 2).

$$\frac{\text{dpm (näyte)}}{\text{dpm (lisätyt kolibakteerisolut)}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

Laktobasillien kolibakteerin kiinnittymisen estoa kuvaava inhibitioprosentti laskettiin kaavan 3 mukaan. Saaduille prosenteille laskettiin keskiarvot sekä keskihajonnat.

(3)

$$\frac{\text{kiinnittyminen (ilman laktobasilleja)} - \text{kiinnittyminen (laktobasillien kanssa)}}{\text{kiinnittyminen (ilman laktobasilleja)}} \cdot 100 \%$$

Kolibakteerisoluista sekä supernatantista otettujen näytteiden avulla laskettiin kolibakteerin leimaamisessa käytetyn tritoidun tymidiinin inkorporaatioprosentti. Sillä haluttiin lähinnä tarkistaa tritoidun tymidiinin tehokkuutta kulkeutua bakteerien sisälle ja kiinnittyä osaksi niiden DNA:ta. Kolibakteerin soluista ja supernatantista mitatuille aktiivisuuksille laskettiin keskiarvot. Supernatantille saatu keskiarvo kerrottiin 300:lla, jotta se vastaisi sitä määrää, josta solut on kerätty. Kolibakteerisolut kerättiin aina 3 ml:sta leimattua bakteerikasvustoa ja suspensoitiin pesujen jälkeen 1,5 ml:aan mediumia, jolloin kolibakteerisolujen keskiarvo kerrottiin vastaavasti 150:lla. Tritoidun tymidiinin inkorporaatioprosentti laskettiin kaavan 4 mukaan.

$$\frac{\text{dpm (solut)}}{\text{dpm (solut) + dpm (supernatantti)}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

#### 3.4 Bakteereiden leimaaminen SYTO9-fluorokromilla

Musiinikiinnittymiskokeita varten tutkittavia laktobasillikantoja leimattiin etukäteen SYTO9 Green -fluorokromilla (Invitrogen, 5 mM). SYTO-fluoresenssiväriaineet ovat nukleiinihappoihin sitoituvia fluorokromeja. Ne sitoutuvat sekä DNA:han että RNA:han ja niitä voidaan käyttää useiden fluoresenssitekniikkaan perustuvien laitteiden kanssa, jotka käyttävät laser- tai perinteisempää valonlähdettä kuten elohopea- tai ksenonlamppua. SYTO9 Green -fluorokromia käytetään erityisesti värjäämään eläviä ja kuolleita Gram-negatiivisia ja -positiivisia bakteereita. [18.]

Kantoja kasvatettiin MRS-liemessä anearobiastiassa +37 °C:ssa yön yli. Bakteerisolut kerättiin sentrifugoimalla 5000 g:n voimalla 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Solut pestiin kahteen kertaan 0,85 % NaCl -liuoksella ja suspensoitiin pesujen jälkeen kasvatustilavuuteen 0,85 % NaCl -liuosta.

Suspensioiden pitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä. SYTO 9-leimaa lisättiin 1 µl jokaista solususpensiomillilitraa kohden ja soluja inkuboitiin huoneenlämmössä voimakkaassa ravistuksessa 15 minuutin ajan valolta suojattuna. Solut kerättiin sentrifugoimalla 4500 g:n voimalla 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Solut pestiin kahteen kertaan leimaustilavuudella PBS-puskuria ja suspensoitiin lopuksi PBS-puskuriin 86 prosenttiin leimaustilavuudesta. Leimattuihin soluihin lisättiin pakastamista varten

steriiliä glyserolia niin, että solususpension glyserolipitoisuus oli 14 %. Solut jaettiin 2 ml:n eriin ja säilytettiin -86 °C:ssa.

Bakteerisolujen leimaamisen onnistuminen tarkistettiin fluoresenssimikroskoopilla sekä suorittamalla kvantitatiivinen tarkistus. Siinä leimattujen bakteeriviljelmien pitoisuudet säädettiin spektrofotometrin avulla niin, että absorbanssi 600 nm:llä oli 1. Tästä pitoisuudesta tehtiin laimennokset, joiden absorbanssit 600 nm:llä olivat 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 ja 0,03125. Kaikkia pitoisuuksia pipetoitiin 96-kuoppalevyille 100 µl yhtä kuoppaa kohden ja kolme rinnakkaista jokaisesta pitoisuudesta. Taustan määrittämistä varten kahteen kuoppaan pipetoitiin 100 µl PBS-puskuria. Näytteiden fluoresenssi mitattiin monileimalukijalla (Victor<sup>3</sup> 1420, Perkin Elmer).

### 3.5 Musiini kiinnittymiskokeet

Musiini kiinnittymiskokeiden tarkoituksena oli testata laktobasillikantojen kiinnittymistä sian ruuansulatuskanavan limaan. Koetta varten päällystettiin edellisenä päivänä tarvittava määrä tasapohjaisia 96-kuoppalevyjä. Kokeissa käytettiin kahta kaupallista porsaan mahasta eristettyä musiinia sekä sian suolistosta eristettyä ja pakastettua suolilimaa, jonka pitoisuus oli 5 mg/ml.

Porsaan type II ja III -musiineista (Sigma-Aldrich, mucin from porcine stomach) valmistettiin ensin kantaliuokset liuottamalla type II -musiinia 1 M NaOH-liuokseen pitoisuuteen 10 mg/ml ja type III -musiinia 0,1 M natriumasetatiliuokseen pitoisuuteen 5 mg/ml. Musiini- sekä suolilimaliuoksista tehtiin PBS-puskuriin käyttöläimennokset, joiden pitoisuudet olivat 0,5 mg/ml. Levyjen päällystäminen suoritettiin pipetoimalla käyttöläimennoksia 100 µl aina yhteen kuoppaan, minkä jälkeen levyjä inkuboitiin +4 °C:ssa yön yli.

Aiemmin SYTO9-leimattuja bakteerikantoja otettiin pakastimesta tarvittava määrä ja sulatettiin +37 °C:ssa vesihauteessa. Työskenneltäessä bakteerit pyrittiin pitämään valolta suojattuina aina kun se oli mahdollista, jotta fluorokromi himmenisi mahdollisimman vähän ennen mittausta. Solut kerättiin sentrifugoimalla 3000 g:n voimalla 5 minuutin ajan 4 °C:ssa. Solut pestiin kahteen kertaan PBS-puskurilla ja suspensoitiin 2 ml:aan PBS-puskuria.



Bakteerisolujen pitoisuus säädettiin spektrofotometrin avulla niin, että absorbanssi 600 nm:llä oli 1. Pitoisuuteen hyväksyttiin 10 prosentin poikkeama kumpaankin suuntaan. Säädetty pitoisuus varmistettiin kahdella rinnakkaisella mittauksella. Säädetyistä laimennoksesta valmistettiin laimennokset, joiden absorbanssit 600 nm:llä olivat 0,5, 0,25 ja 0,1.

Edellisenä päivänä päällystetyistä levyistä ravisteltiin ylimääräiset päällystysliuokset pois ja kuopat pestiin kahdesti 0,01 % Tween 20-PBS-puskurilla. Bakteerilaimennoksia pipetoitiin 100 µl kuoppaa kohden, kolme rinnakkaista näytettä kustakin laimennoksesta. Päällystysliuoksen aiheuttaman taustan määrittämiseksi molemmille musiinityypeille tai porsaan suolilimalle jätettiin kolme rinnakkaista kuoppaa, joihin bakteerilaimennosten sijaan pipetoitiin 100 µl PBS-puskuria. Levyjä inkuboitiin tunnin verran folioon käärittynä +37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt pestiin kolmesti 0,01 % Tween 20-PBS-puskurilla.

Testattavien bakteerien aiheuttaman fluoresenssin määrittämiseksi päällystämättömälle kuoppalevyille pipetoitiin kaikkia bakteerilaimennoksia 100 µl yhtä kuoppaa kohti, kaksi rinnakkaista kutakin. Taustan selvittämiseksi myös PBS-puskuria pipetoitiin kahteen kuoppaan 100 µl. Levyä säilytettiin folioon käärittynä +4 °C:ssa näytteiden mittaukseen asti. Sekä päällystettyjen että päällystämättömien levyjen näytteiden fluoresenssit mitattiin monileimalukijalla.

### 3.6 Musiiniinnittymiskokeiden tulosten käsittely

Musiinilla päällystetyn levyn näytteille mitatuista fluoresenssiarvoista vähennettiin musiinialustasta aiheutuvan taustan keskiarvo. Päällystämättömän levyn mittaus-tuloksista vähennettiin vastaavasti PBS-puskurin aiheuttama taustafluoresenssi. Se, kuinka monta prosenttia näytekuppiin lisätyistä bakteereista oli kiinnittynyt musiinialustaan, laskettiin jakamalla näytteen fluoresenssiarvo sitä vastaavan lisätyn bakteerimäärän fluoresenssiarvolla ja kertomalla 100 prosentilla (kaava 5). Saaduille kiinnittymisprosentteille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat.

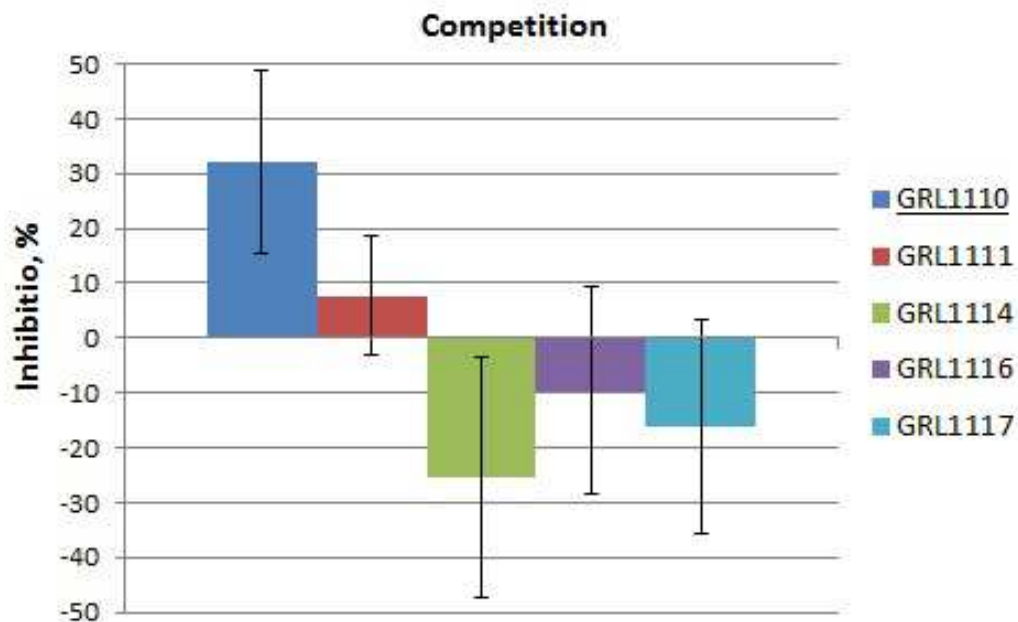
$$\frac{\text{näytteen fluoresenssi} - \text{taustan fluoresenssi (musiini ja PBS)}}{\text{lisättyjen bakteerien fluoresenssi} - \text{taustan fluoresenssi (PBS)}} \cdot 100 \% \quad (5)$$

## 4 Tulokset ja niiden tarkastelu

### 4.1 Kiinnittymisenestokokeiden tulokset

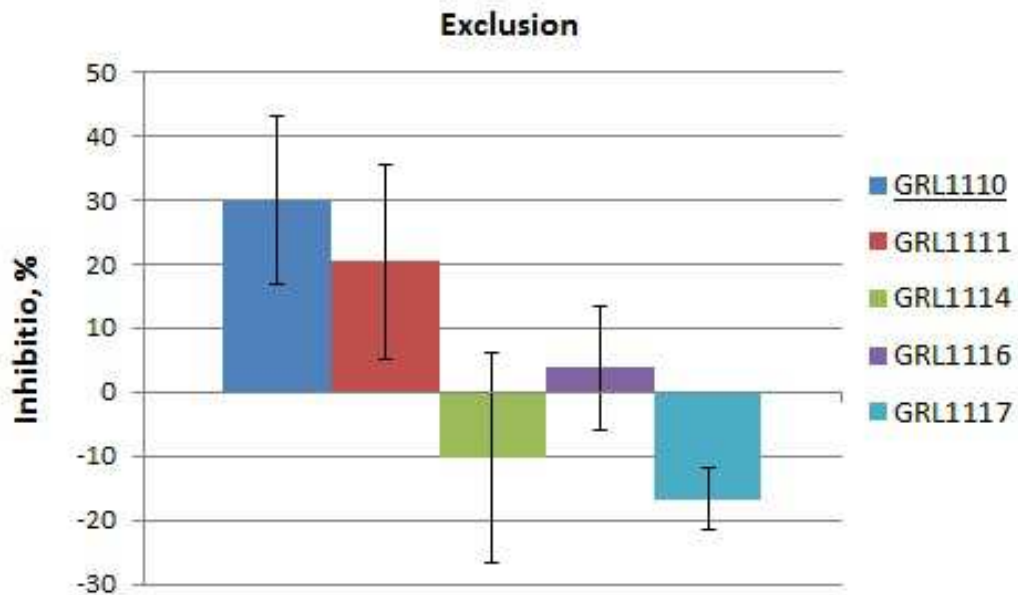
Kiinnittymisenestokokeiden tulokset käsiteltiin osiossa 3.3 esitetyllä tavalla. Tuloksista tehtiin pylväsdiagrammit, joissa on esitetty eri laktobasillikantojen kolibakteerin inhibointiprosentit ja tulosten keskihajonnat (liite 1). Toistokokeiden suorittamisen jälkeen, jokaisen koejärjestelyn tuloksille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat, joiden tuloksista piirrettiin pylväsdiagrammit.

Kompetitiokokeilla saadut tulokset vaihtelivat, minkä vuoksi koe suoritettiin neljä kertaa. Testikantojen kyky inhiboida kolibakteeria jäi positiivista kontrollikantaa heikommaksi tai kannat edistivät kolibakteerin kiinnittymistä (kuva 11). Kompetitio oli koejärjestelyistä ainut, jossa GRL1117-kannalla saatiin tuloksia, joiden mukaan se inhiboi kolibakteeria (liite 1). Kahdessa kokeessa kanta taas edisti runsaasti kolibakteerin kiinnittymistä, joten toistokokeiden keskiarvon mukaan se toimii kolibakteerien kiinnittymistä edistävänä.

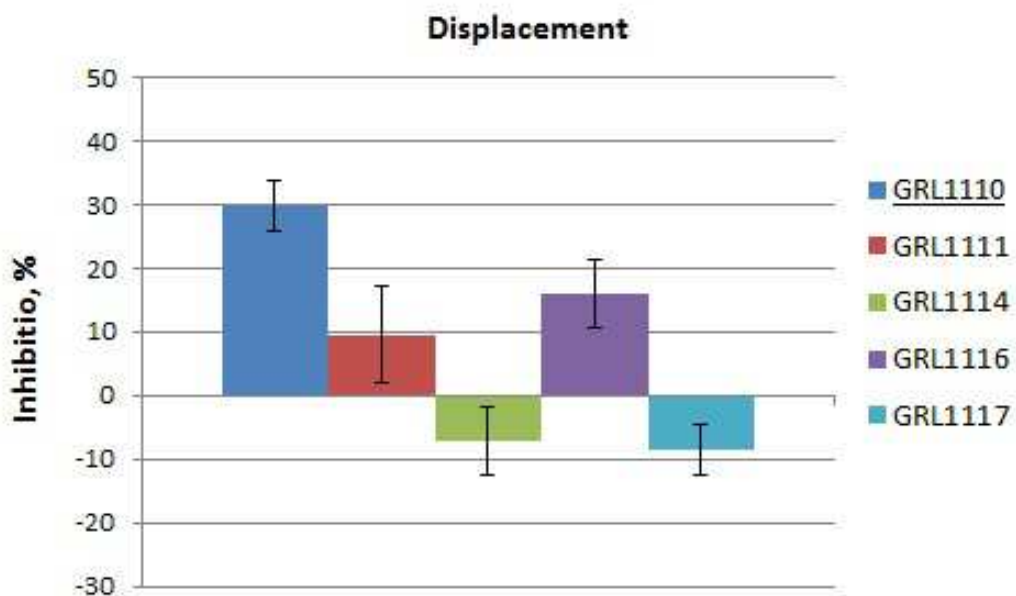


Kuva 11. Kompetitiokokeiden keskiarvot ja keskihajonnat. Kontrollina käytetty kanta on merkitty alleviivaamalla.

Ekskluusiokokeen keskiarvot (kuva 12) on laskettu kolmen toistokokeen tuloksista. Kontrollikanta GRL1110 inhiboi joka koekerralla kolibakteerien kiinnittymistä, kun taas GRL1117-kannan lisääminen edesauttoi niitä kiinnittymään IPEC-1-soluihin. Kolmella muulla laktobasillikannalla saatiin toistokokeissa vaihtelevia tuloksia (liite 1).



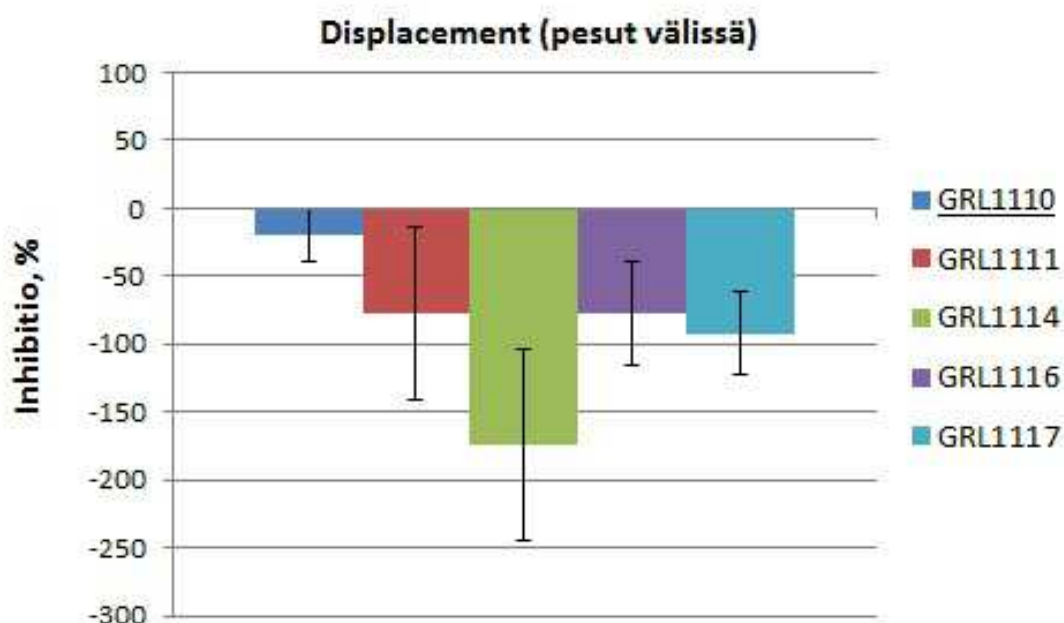
Kuva 12. Ekskluusiokokeiden keskiarvot ja keskihajonnat. Kontrollina käytetty kanta on merkitty alleviivaamalla.



Kuva 13. Displacement-kokeiden keskiarvot ja keskihajonnat. Kontrollina käytetty kanta on merkitty alleviivaamalla.

Displacement-kokeilla saatiin toistettaessa yhteneväisempiä tuloksia kuin kompetitio- ja eksklusiokokeilla (liite 1). Toistokokeita tehtiin yhteensä kolme. Kokeissa kannat GRL1110 ja GRL1116 inhiboivat kolibakteeria ja kannat GRL1117 sekä GRL1114 edistivät sen kiinnittymistä (kuva 13).

Displacement-kokeissa, joissa IPEC-1-solut pestään bakteerien lisäysten välillä, kaikki laktobasillikannat toimivat lähinnä kolibakteerin kiinnittymistä edistävästi (kuva 14). Koe suoritettiin yhteensä neljä kertaa. Positiivisena kontrollina toimineen GRL1110-kannan havaittiin inhiboivan kahdessa kokeessa hieman kolibakteerin kiinnittymistä. Samoin GRL1111-kannalla saatiin kerran tulos, jonka mukaan se inhiboi kolibakteeria (liite 1).



Kuva 14. Displacement-kokeiden, joissa IPEC-1-solut pestiin ennen laktobasillien lisäystä, keskiarvot ja keskihajonnat. Kontrollina käytetty kanta on merkitty alleviivaamalla.

Saatujen tulosten perusteella testattavista neljästä laktobasillikannasta vain GRL1111-kannan voitiin todeta todella inhiboivan enterotoksista kolibakteeria. Muut kolme testikantaa toimivat useimmiten kokeissa kolibakteerin kiinnittymistä edistävästi. GRL1111-kannan inhibointikyky jäi kuitenkin testeissä positiivisena kontrollina käytettyä GRL1110-kantaa huomattavasti heikommaksi. Eksklusio-, displacement- ja kompetitio-kokeissa GRL1111-kannan kolibakteerin inhibointiprosenttien keskiarvot olivat noin 10-20 prosentin välillä. GRL1110-kannalla samojen kokeiden kolibakteerin

inhibointiprosenttien keskiarvot olivat 30 prosentin paikkeilla. GRL1111-kannan inhibointikyky jäi siis usein niin vähäiseksi, ettei sen voitu todeta merkittävästi vaikuttavan kolibakteerin kiinnittymiseen. GRL1111-kannalla saatiin myös GRL1110-kantaa useammin tuloksia, joissa laktobasillin lisääminen edisti kolibakteerin kiinnittymistä.

Laktobasillikannoille suoritetuissa kokeissa, joissa testattiin kantojen kykyä kiinnittyä IPEC-1-soluihin, kantojen GRL1111, GRL1114, GRL1116 ja GRL1117 havaittiin kiinnittyvän GRL1110-kantaa huomattavasti heikommin. Kyseisten kokeiden tuloksia ei ole vielä julkaistu. Samassa pitoisuudessa, jossa GRL1110-kannan bakteereja kiinnittyi IPEC-1-soluihin lisätystä määrästä keskimäärin noin 5,5 prosenttia, GRL1114-kannan bakteereja kiinnittyi noin 2 prosenttia ja kantojen GRL1111, GRL1116 ja GRL1117 bakteereja noin 1 prosentin verran.

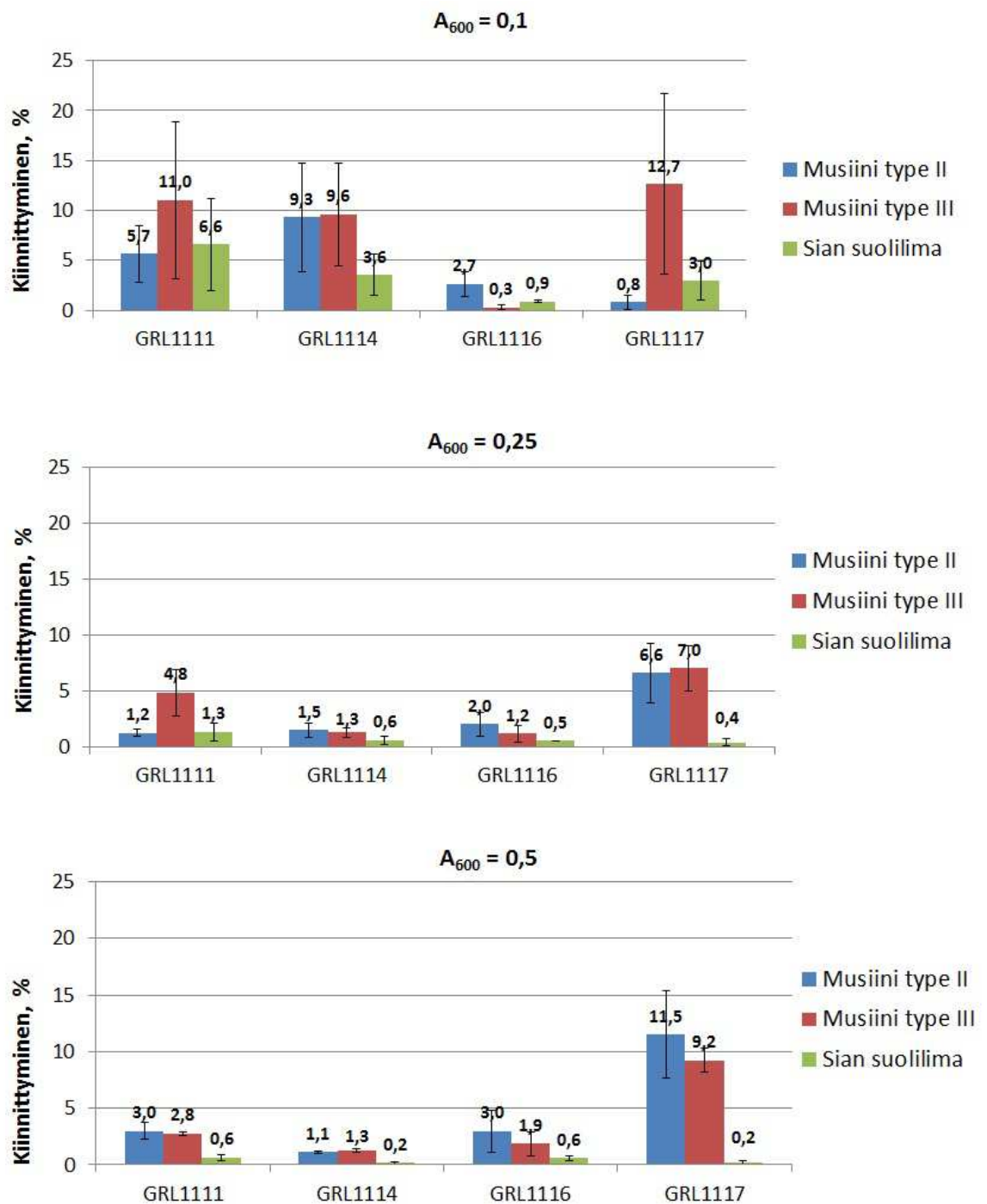
Näiden ja kiinnittymisenestokokeista saatujen tulosten perusteella on mahdollista, että pystyäkseen inhiboimaan kolibakteeria laktobasillien tulisi kiinnittyä IPEC-1-soluihin. Testikantojen ei todettu kiinnittyvän tehokkaasti IPEC-1-soluihin ja niiden kolibakteeria inhiboiva vaikutus oli melko vähäistä tai sitä ei ollut lainkaan. GRL1110-kanta taas kiinnittyi testattavia kantoja tehokkaammin IPEC-1-soluihin ja sen havaittiin inhiboivan selkeästi kolibakteeria kiinnittymisenestokokeissa.

#### 4.2 Musiiniikiinnittymiskokeiden tulokset

Laktobasillien kiinnittymiskykyä testattiin kolmeen eri musiinialustaan ja kokeista saadut tulokset käsiteltiin osiossa 3.6 esitetyllä tavalla. Jokaiselle musiinialustalle kiinnittymistä testattiin kolmella toistokokeella, joiden tuloksille laskettiin lopuksi keskiarvot ja keskihajonnat. Näistä tuloksista piirrettiin pylväsdiagrammit, joissa on esitetty laktobasillikantojen kiinnittyminen testialustoihin prosentteina tietyssä pitoisuudessa.

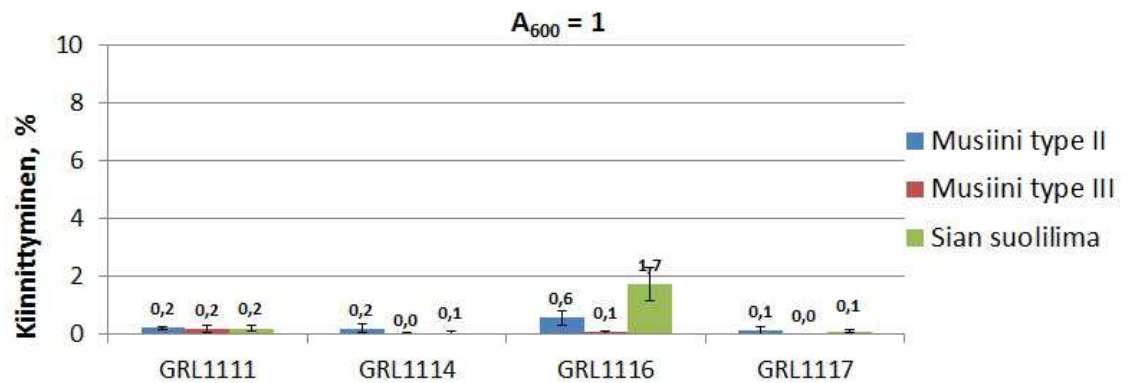
Musiiniikiinnittymiskokeissa havaittiin tutkittavilla kannoilla kiinnittymistä jokaiseen kolmeen musiinialustaan. Toistokokeilla saatiin melko vaihtelevia tuloksia laktobasillien kiinnittymistehokkuudessa alustoihin, ja tulosten suuri keskihajonta heikentää niiden luotettavuutta. Vaihtelevista tuloksista huolimatta laktobasillikannat näyttivät pystyvän

kiinnittymään paremmin kaupallisiin sian vatsan musiineihin kuin sian suolistosta eristettyyn limaan (kuva 15).



Kuva 15. Musiiniälystöihin kiinnittyneiden laktobasillien osuus prosentteina pitoisuuksissa, joiden absorbanssit ovat 0,1, 0,25 ja 0,5, kolmen toistokokeen keskiarvot ja keskihajonnat

Pitoisuudessa, jonka absorbanssi 600 nm:llä on 1, laktobasillit eivät kiinnittyneet juurikaan testattaviin musiinialustoihin (kuva 16). Kyseinen ilmiö havaittiin jokaisen suoritettujen toistokokeiden kohdalla, mutta syytä siihen ei saatu selville.



Kuva 16. Musiinialustoihin kiinnittyneiden laktobasillien osuus prosentteina 1,0-pitoisuudessa, kolmen toistokokeen keskiarvot ja keskihajonnat

## 5 Päätelmät

Musiinikiinnittymiskokeissa tutkittavien laktobasillikantojen havaittiin kiinnittyvän testialustoihin. Suoritetuilla kokeilla saatiin vaihtelevia tuloksia kiinnittymistehokkuuden suhteen, mikä heikentää tulosten luotettavuutta. Laktobasillit vaikuttivat pystyvän kiinnittymään paremmin kaupallisiin sian vatsan musiineihin kuin sian suolistosta eristettyyn lima.

Kiinnittymisenestokokeissa vain yhden testattavista laktobasillikannoista voitiin havaita inhiboivan enterotoksista kolibakteeria. GRL1111-kannan inhibointikyky oli testeissä kuitenkin positiivisena kontrollina käytettyä GRL1110-kantaa huomattavasti heikompa, ja useassa testissä GRL1111-kannan kolibakteerien inhibointi oli niin vähäistä, ettei sen voitu todeta merkittävästi vaikuttavan kolibakteerin kiinnittymiseen. GRL1111-kannalla saatiin myös positiivista kontrollikantaa useammin tuloksia, joiden mukaan laktobasillin lisääminen ei ollut inhiboinut kolibakteerin kiinnittymistä. Muut kolme testikantaa, GRL1114, GRL1116 sekä GRL1117, onnistuivat toisinaan inhiboimaan kolibakteeria, mutta useimmissa testeissä niiden lisääminen edesauttoi kolibakteerin kiinnittymistä IPEC-1-soluihin.

Kiinnittymiskokeiden, joiden tulokset ovat julkaisemattomia, perusteella neljän testikannan havaittiin sitoutuvan IPEC-1-soluihin, huomattavasti heikommin kuin GRL1110-kanta. Tulosten perusteella kiinnittymistehokkuus IPEC-1-soluihin näyttäisi olevan yhteydessä testattujen laktobasillien kykyyn inhiboida kolibakteeria. Neljä testikantaa kiinnittyivät heikosti IPEC-1-soluihin ja niiden kyky estää kolibakteerin kiinnittymistä oli vähäistä tai olematonta.



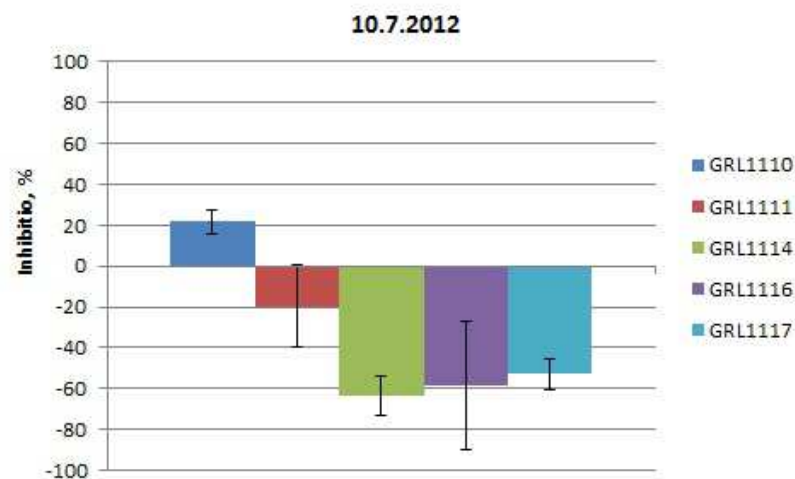
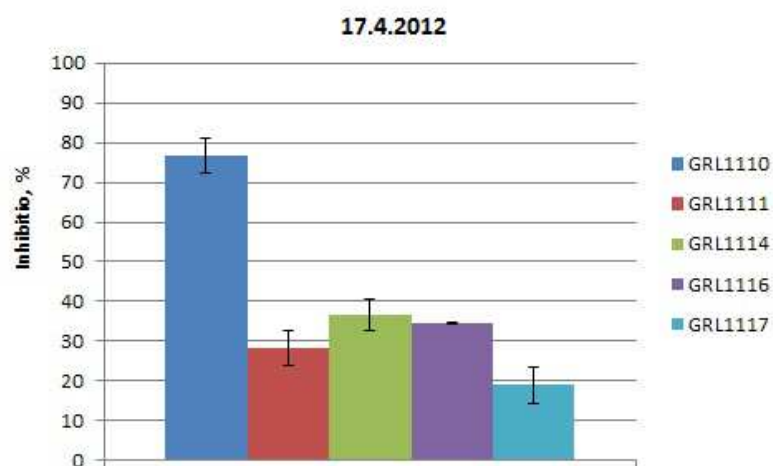
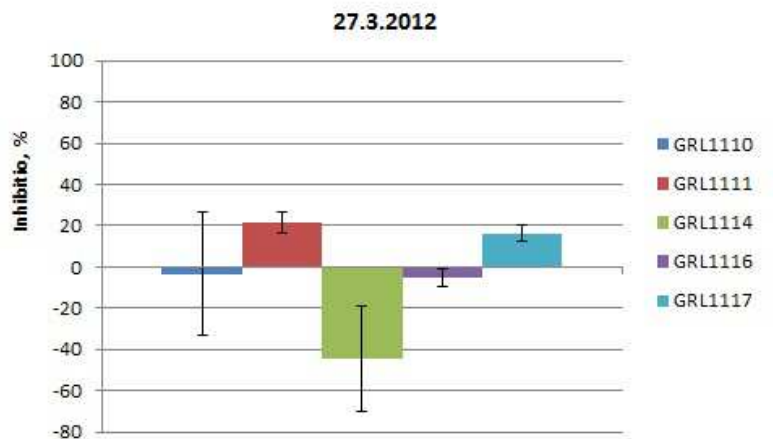
## Lähteet

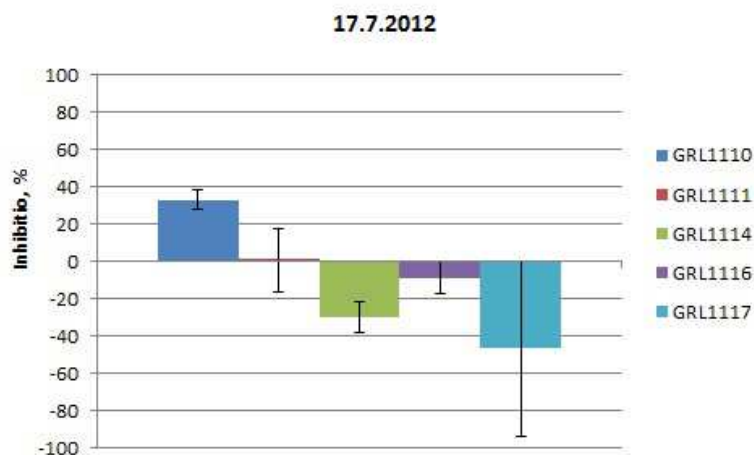
- [1] Kolhinen, R. ym. 2002. Porsaiden vieroitusopas. Helsinki: Maa- ja metsätalousministeriö
- [2] Bergey, D. & Holt, J. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.
- [3] Francis, D. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. Journal of Swine Health and Production. 4/2002, s. 171–175.
- [4] Ross, M., Kaye, G. & Pawlina, W. 2003. Histology: a text and atlas. Fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [5] Solunetti. 2006. Histologia: ohutsuoli. Verkkodokumentti.  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/ohutsuoli/>. Luettu 24.9.2012
- [6] Solunetti. 2006. Histologia: pohjukaissuoli. Verkkodokumentti.  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/duodenum-forstoring/>. Luettu 24.9.2012
- [7] Salminen, S., Isolauri, E. & Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie Van Leeuwenhoek. 2/1996, s. 347–358.
- [8] Mercenier, A., Pavan, S. & Pot, B., 2003. Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present knowledge and future prospects. Current Pharmaceutical Design. 2/2003, s. 175–191.
- [9] Åvall-Jääskeläinen, S., *Lactobacillus* surface layers and their applications. FEMS Microbiology Reviews. 3/2005, s. 511–529.
- [10] Jakava-Viljanen, M. 2007. Characterisation of porcine-specific surface (S-) layer protein carrying *Lactobacillus* species, S-layer proteins and the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae - potential applications for veterinary medicine. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta.
- [11] Hynönen, U. 2009. Structural and functional characterization of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta.
- [12] Nakamura, L. K. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol 31, s. 56–63.

- [13] Roselli, M., ym. 2007. The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. 12/2007. s. 2709–2716.
- [14] National Diagnostics. 2004. Principles and applications of liquid scintillation counting. Verkkodokumentti. [http://www.ehs.psu.edu/radprot/LSC\\_Theory2.pdf](http://www.ehs.psu.edu/radprot/LSC_Theory2.pdf). Luettu 9.5.2012.
- [15] University of Wisconsin. Liquid scintillation counting. Verkkodokumentti. [http://www.bio.huji.ac.il/upload/Beta\\_Counter\\_Protocol.pdf](http://www.bio.huji.ac.il/upload/Beta_Counter_Protocol.pdf). Luettu 14.5.2012.
- [16] The Health Physics Society. 2011. Tritium. Verkkodokumentti. [http://hps.org/documents/tritium\\_fact\\_sheet.pdf](http://hps.org/documents/tritium_fact_sheet.pdf). Luettu 10.5.2012.
- [17] Koh, S. ym. 2008. Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology. 1/2008, s. 191–197.
- [18] Invitrogen. 2011. SYTO Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains product manual. Verkkodokumentti. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07572.pdf>. Luettu 23.5.2012.

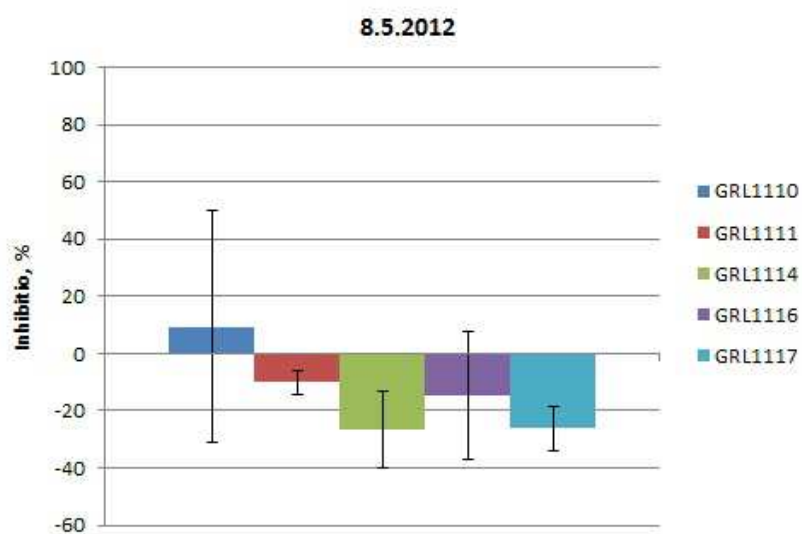
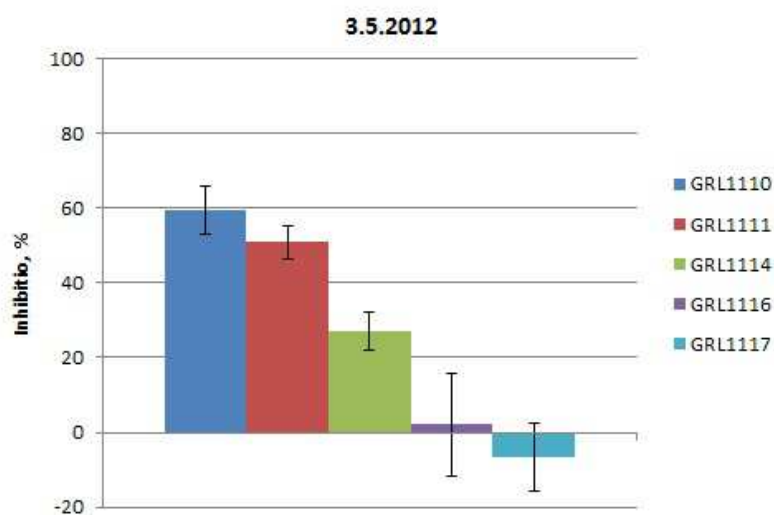
## Kiinnittymisenestokokeiden tulokset

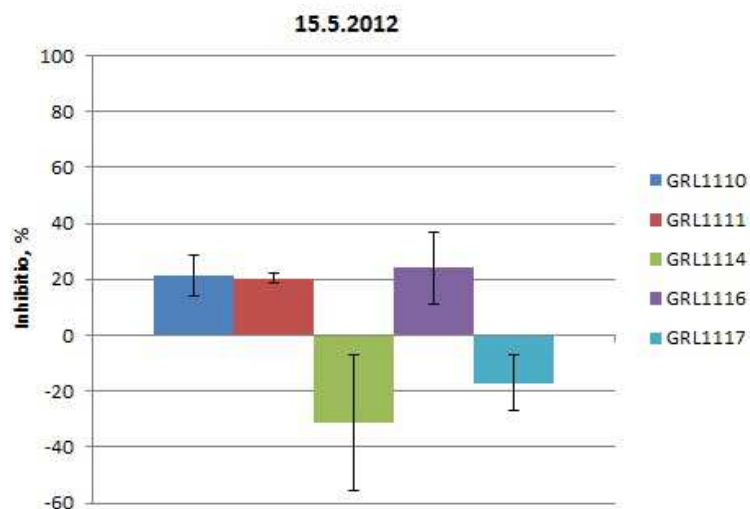
Kompetitiokokeiden inhibitioprosentit ja keskihajonnat



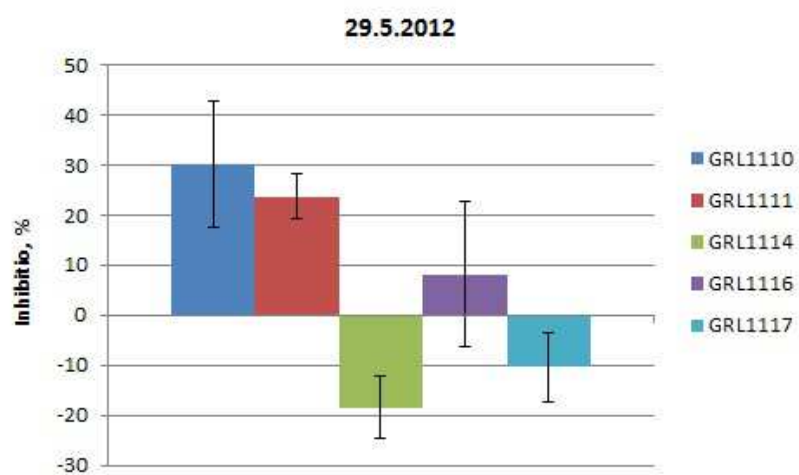
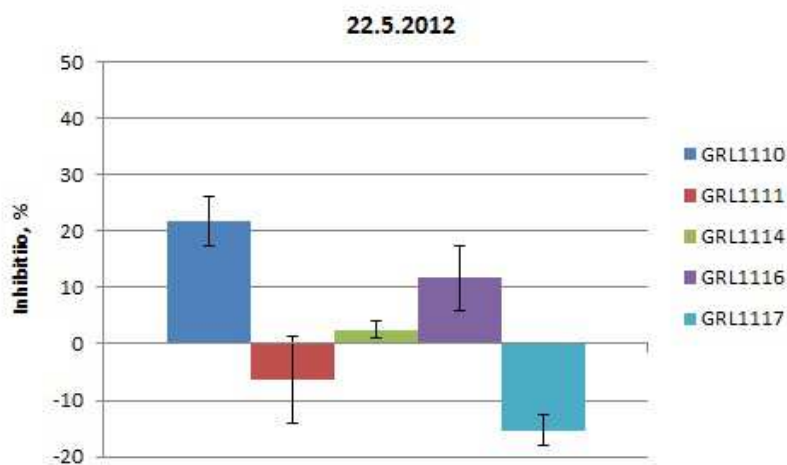


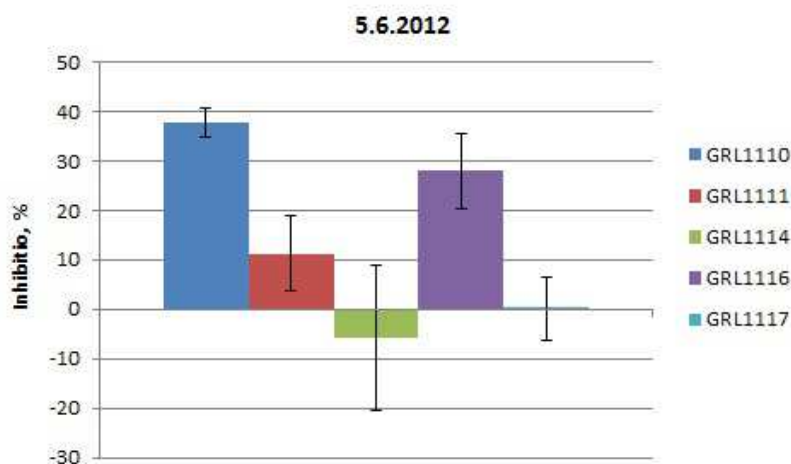
Eksluusiokokeiden inhibitioprosentit ja keskihajonnat





Displacement-kokeiden inhibitioprosentit ja keskihajonnat





Displacement-kokeiden, joissa IPEC-1-solut pestiin ennen laktobasillien lisäystä, inhibitioprosentit ja keskihajonnat

